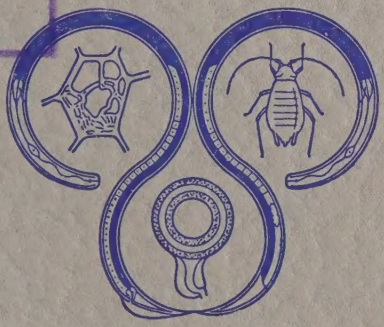
TIJDSCHRIFT OVER PLANTEZIEKTEN

COMMONWEALTH INST.
ENTOMOLOGY LIBRARY
- 3 MAR 1958
SERIAL Eu.8b
SEPARATE

JAARGANG 63 - 1957

6e AFLEVERING



Uitgave van de

NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Onder Redactie van

Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr. J. A. A. M. H. GOOSSENS;
Prof. Dr. A. J. P. OORT; Mej. F. QUAK; Dr. J. P. H. VAN DER WANT
en Dr. H. J. DE FLUITER (Secretaris)

Redactie-adres: Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek,
Binnenhaven 4*a*, Wageningen

BESTUUR

VAN DE NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Dr. P. M. L. Tammes, Wageningen, *Voorzitter*
Ir. J. A. J. Veenenbos, Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, *Secretaris*
Dr. A. P. Kole, Lab. v. Phytopathologie, Binnenhaven 4, Wageningen, *le Penningmeester.* Postrekening no. 346310 ten name van Penningmeester van de Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging te Wageningen
Mej. F. Quak, Binnenhaven 4a, Wageningen, *2e Penningmeesteresse*
A. van Herwijnen, St. Pancras
Dr. Ir. C. Mastenbroek, Hoofddorp
Prof. Dr. A. J. P. Oort, Wageningen
P. Smeding, Leeuwarden

Lidmaatschap Ned. Planteziektenkundige Vereniging

Nederland, Indonesië, Suriname en Curaçao f 7,50, België f 7,50, Buitenland f 8.50. Leden ontvangen het tijdschrift gratis.

Abonnement Tijdschrift

Nederland, Indonesië, Suriname en Curaçao f 10,—, België f 10,—. Buitenland f 13,50 Betalingen op postrekening 346310 t.n.v. Penningmeester Ned. Planteziektenkundige Vereniging te Wageningen.

Advertentiën

Prijzen per plaatsing: ⅛ pag. f 12,50; ¼ pag. f 20,—; ½ pag. f 30,—; 1 pag. f 55,—.
Bij 3 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 procent korting.
Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 20 procent korting.

Voor plaatsing wende men zich tot de secretaris der Redactie-Commissie, p.a. Binnenhaven 4*a*, Wageningen, tel. 2151, of tot H. Veenman & Zonen, Wageningen, tel. 2242.

INHOUD

HOOFDARTIKELEN

H. W. J. RAGETLI – Onderzoekingen over een virusremstof voorkomend in Dianthus caryophyllus L. Werkingsspectrum, remmingsmechanisme en aard. *With a summary: Behaviour and nature of a virus inhibitor occurring in Dianthus caryophyllus L.* . . . 245

M. OOSTENBRINK, J. J. s'JACOB en K. KUIPER – Over de waardplanten van *Pratylenchus penetrans. With a summary: On the host plants of Pratylenchus penetrans* . . . 345

A. P. KOLE – Elektronenmicroscopische waarnemingen over de zoösporen uit de zomersporangia van *Synchytrium endobioticum* (SCHILB.) PERC. *With a summary: Electron microscope observations on the soral zoospores of Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc.* . . . 361

P. A. VAN DER LAAN en C. A. HUISMAN – Een waarneming over het voorkomen van fysiologische rassen van het aardappelcystenaaltje, welke zich sterk kunnen vermeerderen in resistente nakomelingen van *Solanum tuberosum* subsp. *andigena. With a summary: A record of the existence of physiologic races of the potato root eelworm, which multiply vigorously in resistant progeny of Solanum tuberosum subsp. andigena* 365

G. P. TERMOHLEN – Kurkwortelverschijnselen van tomaat, veroorzaakt door een steriel mycelium. II. *With a summary: Corky root of tomato caused by a sterile mycelium.* II. 369

J. A. J. VEENENBOS en T. W. BRANDSMA – Kunstmatige besmetting van haver met stuifbrand, *Ustilago avenae* (PERS.) JENS. *With a summary: Artificial contamination of oats with loose smut, Ustilago avenae (Pers.) Jens* . . . 375

Verenigingsnieuws . . . 380

BOEKBESPREKING

DOCTERS VAN LEEUWEN, W. M. met medewerking van H. ALTA en J. GREMMEN Gallenboek. Bibliotheek der Kon. Ned. Natuurhistorische Vereniging, uitgave no. 8 2e druk. Uitg. W. J. Thieme & Cie, Zutphen (door W. NIJVELDT) . . . 380

T. Pl.ziekten 63 (1957): 245–344

ONDERZOEKINGEN OVER EEN VIRUSREMSTOF VOORKOMEND IN DIANTHUS CARIOPHYLLUS L.

WERKINGSSPECTRUM, REMMINGSMECHANISME EN AARD

With a summary: Behaviour and nature of a virus inhibitor occurring in Dianthus Caryophyllus L.

DOOR

H. W. J. RAGETLI

Laboratorium voor Virologie, Landbouwhogeschool, Wageningen

(Mededeling 5)

INHOUD

I. Inleiding 247
1. Ontdekking van de inhibitor(en) uit anjer 247
2. Het begrip virusremstof 248
3. Doelstelling van het eigen onderzoek 249

II. Werkingsspectrum van de inhibitor uit anjer 250
1. Inleiding 250
2. Afbakening van het terrein van onderzoek 250
2.1. Criterium van werkzaamheid van de inhibitor 250
2.2. Keuze van virussen en waardplanten 251
3. Methodieken 255
4. Proeven 258
4.1. Uitvoering 258
4.2. Resultaten 261
4.3. Analyse der verkregen resultaten en conclusies 263
5. Samenvatting 269

III. Nader onderzoek naar het aangrijpingspunt van de inhibitor uit anjer 270
1. Inleiding 270
2. Is de mate van remming afhankelijk van de tijd, gedurende welke inhibitor- en virusoplossing gemengd voorkwamen? 271
2.1. Proeven 271
2.1.1. Uitvoering der proeven 271
2.1.2. Resultaten der proeven 271
3. Scheiding van virus en anjerinhibitor in vitro 273
3.1. Proeven met toepassing van ultracentrifugering 273
3.1.1. Uitvoering der proeven 274
3.1.2. Resultaten der proeven 275
3.2. Proeven met uitzouttechnieken 280
3.2.1. Uitvoering der proeven 281
3.2.2. Resultaten der proeven 281

4. Gescheiden toediening van virus en anjerinhibitor aan het toetsobject . . . 283
4.1. Proeven . . . 283
4.1.1. Uitvoering der proeven . . . 283
4.1.2. Resultaten bij toediening van de inhibitor na de inoculatie . . . 284
4.1.3. Resultaten bij toediening van de inhibitor vóór de inoculatie . . . 287
5. Betekenis van de eiwitmantel voor het zich doen gelden van de inhibitor uit anjer . . . 288
5.1. Proeven . . . 288
5.1.1. Uitvoering der proeven . . . 289
5.1.2. Resultaten der proeven . . . 291
6. Samenvatting . . . 293
IV. Isolering en karakterisering van de inhibitor uit anjer . . . 295
1. Inleiding . . . 295
2. Isolering van de inhibitor uit anjer . . . 296
2.1. Isolering door uitsluitende toepassing van ultracentrifugering 296
2.1.1. Uitvoering der proeven . . . 296
2.1.2. Resultaten der proeven . . . 298
2.2. Isolering door precipitatie met behulp van $(NH_4)_2SO_4$ . . . 299
2.2.1. Uitvoering der proeven . . . 300
2.2.2. Resultaten der proeven . . . 302
3. Karakterisering en verdere zuivering van de inhibitor . . . 303
3.1. Bepaling en analyse der sedimentatiediagrammen van enige oplossingen . . . 303
3.2. Papierelektroforetisch onderzoek . . . 304
3.2.1. Methodieken en uitvoering der proeven . . . 305
3.2.2. Resultaten . . . 309
4. Conclusies . . . 314

V. Kritische bespreking van literatuur betreffende de virusremming door in de natuur voorkomende remstoffen . . . 316
1. Inleiding . . . 316
2. Aard en eigenschappen van enige in de natuur voorkomende virusremstoffen . . . 317
3. Conclusies en theorieën over de aard der remstofwerking . . . 321

VI. Algemene samenvatting . . . 328

Summary . . . 330

Literatuur . . . 339

Addendum I . . . 341

Addendum II . . . 343

HOOFDSTUK I

INLEIDING

1. ONTDEKKING VAN DE INHIBITOR(EN) UIT ANJER

Bij onderzoekingen over anjermozaiek in de loop van 1950 bleek de overbrenging van de ziekteverwekker van zieke anjers op andere toetsplanten dan anjer (*Dianthus caryophyllus*) en duizendschoon (*Dianthus barbatus*) zeer moeilijk of onmogelijk (NOORDAM et al., 1951). Zo werden op aster (*Callistephus spec.*) en tabak (*Nicotiana tabacum* var. White Burley) met sap van zieke anjers slechts in een enkel geval een gering aantal lokale vlekken verkregen, terwijl boon (*Phaseolus vulgaris*) in het geheel niet reageerde. Boneplanten, geïnoculeerd met sap van met anjermozaiekvirus besmette duizendschoon- of tabaksplanten gaven echter wel talrijke necrotische vlekjes te zien. Op grond van het bovenstaande, mede gelet op de hoge virusconcentratie in anjer, zoals die bij toetsing van een verdunningsreeks op duizendschoon gebleken was (verdunningsgrens lager dan 10^{-5}, NOORDAM et al., 1951) kwam VAN DER WANT (1951) tot het aannemen van een factor in de anjer, die anjermozaiekvirus ten opzichte van aster, boon en tabak onwerkzaam maakt. Het voorkomen in anjersap van een dergelijke factor – remstof of inhibitor genaamd – kon door deze auteur nog nader bevestigd worden in inoculatieproeven, waarbij sap van tabaksplanten besmet met respectievelijk een tabaksnecrosevirus, tabaksmozaiekvirus en ratelvirus gemengd werd met een gelijk volume sap, afkomstig van gezonde anjerzaailingen (VAN DER WANT, 1951). Toetsplanten, te weten *Nicotiana tabacum* en *Nicotiana glutinosa*, ingewreven met genoemde mengsels, vertoonden geen of een zeer gering aantal lokale vlekken. Werd daarentegen in plaats van anjersap een gelijk volume water toegevoegd, dan ontstonden na inoculatie op de toetsplanten een zeer groot aantal vlekken. De remmende factor bleek dus zowel in zieke als in gezonde anjers voor te komen.

Latere, niet gepubliceerde onderzoekingen, brachten VAN DER WANT (1953) tot de overtuiging, dat de factor in anjersap die de ontwikkeling der ziektesymptomen remt, samengesteld van aard is. Naast een niet dialyseerbare remstof zou een dialyseerbare voorkomen. De niet dialyseerbare remstof – gedialyseerd werden de mengsels virusoplossing-anjersap – bleek tabaksmozaiekvirus op *Nicotiana glutinosa* en anjermozaiekvirus op boon te remmen (VAN DER WANT, 1953). De dialyseerbare component werd als zodanig onderkend, door de remmende werking, die de buitenvloeistof – verkregen bij een niet aflopende dialyse van anjersap – tegenover tabaksmozaiekvirus vertoonde, na inoculatie van een mengsel van beide op bladeren van *Nicotiana glutinosa* (VAN DER WANT, mondelinge mededeling). *Gomphrena globosa*, een geschikte toetsplant zowel voor anjermozaiekvirus als voor tabaksnecrosevirus, bleek ten aanzien van de werkzaamheid van de anjerinhibitor, althans voor wat de niet dialyseerbare component betreft, een tussenplaats in te nemen tussen anjer en duizendschoon enerzijds en boon en tabak anderzijds. VAN DER WANT (1953) schrijft letterlijk: „This plant (*Gomphrena globosa*) can be used as a bridge in

the transmission of the virus from diseased carnations to tobacco and bean. Generally, the carnation virus is more easily transmissable from carnation to Gomphrena than to tobacco or bean."

2. HET BEGRIP VIRUSREMSTOF

In het voorgaande is het woord virusremstof of virusinhibitor gebruikt om stoffen aan te duiden, die, indien zij tegelijk met het virus in de inoculatievloeistof voorkomen, het optreden van ziektesymptomen op de geïnoculeerde toetsplant verhinderen, of die, indien het ziektebeeld gekenmerkt wordt door een lokale reactie, het aantal vlekken aanzienlijk reduceren.

Ter nadere karakterisering van de in de hogere planten voorkomende virusremstoffen, stelde VAN DER WANT (1951) voor deze te onderscheiden in relatieve en absolute virusremstoffen. Een relatieve virusremstof zou volgens deze auteur een stof zijn, die in een viruszieke plant voorkomend, de overbrenging van het virus met het sap op soortvreemde toetsplanten onmogelijk maakt. Absolute virusremstoffen daarentegen zouden ook de overbrenging van het virus door middel van sap binnen de eigen soort verhinderen.

Volgens deze, het werkingsspectrum van de remstof aanduidende terminologie, zou(den) de anjerremstof(fen) een relatief karakter bezitten.

Als een voorbeeld van absolute remstoffen zou VAN DER WANT (1951) de in dahlia voorkomende looistoffen willen zien, daar zij zelfs de overbrenging van dahliamozaiekvirus van dahlia op dahlia onmogelijk maken (CORNUET et al., 1950).

Een andere analyse van het begrip virusremstof is door BAWDEN (1954) gegeven. Zij werd gebaseerd op wat wij zouden willen noemen de werkings-„diepte" der inhibitoren. Deze auteur onderscheidt namelijk „inhibitors of infection" en „inhibitors of virus increase", die op grond van hun definitie vermoedelijk meer oppervlakkig dan wel in „diepere" regionen van het geïnoculeerde orgaan werkzaam zijn. Onder „inhibitors of infection" verstaat BAWDEN stoffen, die tegelijk met het virus geïnoculeerd, het optreden van symptomen verhinderen. „Inhibitors of virus increase" definieert hij als stoffen, die – toegevoegd aan reeds geïnoculeerde organen – de snelheid, waarmee het ingebrachte virus zich vermeerdert, verlagen.

Van de „inhibitors of infection" zegt BAWDEN verder, dat zij geen chemische specificiteit bezitten, daar een reeks van uiteenlopende verbindingen deze werking bezit. De gegeven definitie is voor dit type inhibitors echter veel te ruim, daar een verhindering van de infectie op zeer verschillende wijzen tot stand kan komen.

Bij het hanteren van het begrip „inhibitors of infection" zouden wij altijd een poging willen doen om te onderscheiden tussen een remming, die het gevolg is van een actie op het virus en een, die voortvloeit uit een inwerking op de waardplant. De „inhibitors of infection", wier werkzaamheid berust op een aangrijpen op het virus zelf, zouden wij, afhankelijk van de aard van de inwerking, nog in bepaalde categorieën ingedeeld willen zien. Daar het niet onmogelijk is, dat sommige „inhibitors of infection", wanneer zij kort na de inoculatie van een planteorgaan met een virushoudende oplossing aan dit orgaan worden toegevoegd, de reeds tot stand gekomen infectie weer ongedaan kunnen maken,

is het duidelijk, dat de door BAWDEN gemaakte indeling nog moeilijkheden oplevert. Daarom zou het aanbeveling verdienen in de definitie van de „inhibitors of infection" de mogelijkheid van een gescheiden toediening van inhibitor en virus aan de toetsplant toe te voegen, en in de definities van beide typen van inhibitoren tevens het tijdselement in te voeren.

Dit laatste dringt te meer, daar de processen van infectie en virusvermeerdering ook na elkaar verlopen, althans met een zekere tussentijd manifest worden. De grootte van dit tijdsbestek is voor de meeste virussen en waardplanten echter niet bekend, waardoor zich in ernstige mate een element van onzekerheid voordoet bij het kwalificeren van inhibitoren volgens de principes van BAWDEN.

3. DOELSTELLING VAN HET EIGEN ONDERZOEK

Het primaire doel, dat met de in de volgende hoofdstukken te beschrijven onderzoekingen werd beoogd, was: een inzicht te verkrijgen in het mechanisme, dat ten grondslag ligt aan de onderdrukking van door virussen veroorzaakte ziektesymptomen bij hogere planten door de inhibitor(en)[1]) uit anjer. Hiertoe diende allereerst de uitgebreidheid van het terrein van werkzaamheid van de anjerinhibitor, zowel met betrekking tot de virussen als tot de waardplanten, nader te worden bepaald.

Behalve een afbakening van het werkingsspectrum van de anjerinhibitor, is ook een opheldering van de aard ervan van wezenlijk belang voor een bestudering van het mechanisme der virusremming door deze inhibitor. Gepoogd werd dan ook tot een isolering en zuivering van de anjerinhibitor te komen, alsmede tot een nadere karakterisering.

Als secundair doel van dit onderzoek werd nagestreefd, om door middel van de verkregen resultaten en de verworven inzichten, een kritische bijdrage te leveren tot de kennis der virusinhibitie bij hogere planten in het algemeen. Bij het bestuderen der literatuur op dit gebied, blijken namelijk vaak zeer fundamentele uitspraken te berusten op gebrekkige of onvolledige proeven, terwijl men herhaaldelijk op ongemotiveerde generalisaties stoot.

Tot slot werd gedacht aan de mogelijkheid om – vooral indien het aangrijpingspunt van de anjerinhibitor in de waardplanten zou blijken te liggen – via het mechanisme der virusremming een nieuw aanknopingspunt te vinden voor de benadering van het probleem der virusinfectie.

[1]) Daar in de loop van het eigen onderzoek gebleken is, dat het remmende principe uit anjers enkelvoudig van aard is, zie onder andere III.3.1. zal verder steeds van inhibitor gesproken worden. Gemakshalve zal daar, waar inhibitor uit anjer bedoeld is, ook soms het woord anjerinhibitor worden gebruikt.

HOOFDSTUK II

WERKINGSSPECTRUM VAN DE INHIBITOR UIT ANJER

1. INLEIDING

Met de vaststelling van het werkingsspectrum van de anjerinhibitor, of althans van een aanzienlijk deel van dit spectrum, werd beoogd de basis te leggen voor verdere onderzoekingen en overwegingen aangaande het mechanisme van de onderdrukking der virusinfectie in dit bijzondere geval.

In het algemeen zal een remming der virusinfectie, die het gevolg is van de aanwezigheid van een chemische verbinding naast het virus, op een der hieronder te noemen wijzen tot stand moeten komen.

a. De actieve stof werkt uitsluitend op het virus.
b. De actieve stof werkt uitsluitend op de waardplant.
c. De actieve stof werkt weliswaar primair op het virus, maar de waardplant bepaalt in belangrijke mate het uiteindelijk effect van deze inwerking.

Tenzij het onder a. genoemde mechanisme leidt tot een irreversibele complexvorming of afbraak van het virus, zal het zeer moeilijk zal zijn definitief ten gunste van een van de drie mogelijkheden te beslissen, omdat het effect in alle gevallen gelijk is.

Hoewel de constatering, dat bepaalde virussen wèl en andere niet geremd worden op dezelfde waardplant, zonder meer nog niet de conclusie wettigt, dat de actieve stof dus met het virus zal reageren – evenmin als de vaststelling, dat alle getoetste virussen op dezelfde waardplanten wel of niet geremd worden, alleen al het oordeel rechtvaardigt, dat de stof dus op de waardplant zal aangrijpen – zullen proeven, gebaseerd op een variatie van virussen en waardplanten een onmisbare voorwaarde zijn voor verdere onderzoekingen en beschouwingen. Op grond van de resultaten der in dit hoofdstuk te bespreken experimenten, zal een voorlopige uitspraak worden gedaan over het mogelijke karakter van de virusinhibitie door de anjerinhibitor. In hoofdstuk III zal deze uitspraak nader worden getoetst.

2. AFBAKENING VAN HET TERREIN VAN ONDERZOEK

2.1. Criterium van werkzaamheid van de inhibitor

Aanvankelijk werden twee criteria aangehouden, namelijk:

1. Het al of niet optreden, eventueel ook het verminderde optreden, van ziektesymptomen op toetsplanten, geïnoculeerd met een mengsel van gelijke volumedelen onverdund sap van viruszieke planten (eventueel ook de verdunning 10^{-1} hiervan) en onverdund anjersap.
2. Het al of niet optreden van symptomen op waardplanten van anjermozaiekvirus na inoculatie met sap, afkomstig van met dit virus besmette anjers.

Het onder 1. genoemde criterium werd gehanteerd in de proeven, waarbij de

werkzaamheid van de anjerinhibitor ten aanzien van verschillende virussen werd nagegaan.

Toen bleek, dat bij de getoetste virussen geen overtuigende verschillen bestonden met betrekking tot hun reactie op de inhibitor, werden in de volgende proeven vooral de waardplanten gevarieerd. Hierbij werd in het begin gewerkt met anjermozaiekvirus in sap van met dit virus besmette anjers, terwijl uiteraard de onder 2. genoemde maatstaf voor de werkzaamheid werd aangelegd. Op deze wijze konden een aantal plantesoorten in twee groepen worden verdeeld, namelijk, een groep ten aanzien waarvan de remstof werkzaam was en een tweede waartegen deze remstof onwerkzaam scheen. Deze wijze van toetsing liet immers niet toe kwantitatieve verschillen in de werkzaamheid te signaleren.

Teneinde te kunnen uitmaken of de gevonden verschillen inderdaad van kwantitatieve aard waren, werd het werken met sap van mozaiekzieke anjers opgegeven en werden de proeven als volgt voortgezet. Van iedere verdunning uit een verdunningsreeks van een bepaalde virusoplossing werd een zeker volume gemengd met een gelijk volume gezond anjersap, terwijl dit mengsel getoetst werd tegen een mengsel van dezelfde virusverdunning en een gelijk volume water. Als bij waardplanten de anjerinhibitor absoluut onwerkzaam zou zijn, zou de verdunningsgrens voor de toets en de controle gelijk moeten zijn.

Nadat was gebleken, dat de werkzaamheid van de remstof werd bepaald door eigenschappen van de toetsplant, lag het voor de hand eerstgenoemd begrip te koppelen aan het begrip gevoeligheid. Naarmate in een toetsserie de symptomen van de virusinfectie eerst bij een hogere verdunningsgraad van de virusoplossing volledig achterwege zouden blijven, zou de betreffende waardplant minder gevoelig heten voor de inhibitor uit anjer. Op deze wijze zouden de toetsplanten in een reeks gerangschikt kunnen worden naar aflopende gevoeligheid voor de remstof.

2.2. Keuze van virussen en waardplanten

Virussen.

De eerste twee voorwaarden, waaraan de in dit onderzoek te betrekken virussen dienden te voldoen, waren, dat zij:

a. gemakkelijk op mechanische wijze op de toetsplanten konden worden overgebracht (bijvoorbeeld door de virusoplossing met de vinger uit te strijken op het te inoculeren blad);
b. in uitgeperste toestand in het ruwe plantesap behoorlijk stabiel waren.

Uitgaande hiervan werd verder een zodanige keus gemaakt, dat de verschillende virussen zowel wat betreft morfologische geaardheid als in fysisch-chemische eigenschappen duidelijk van elkaar verschilden, zie tabel 1.

In een enkel geval, namelijk bij het stoppelknolvirus, werd het virus speciaal gekozen, zodat een bepaalde plantenfamilie, namelijk die der Cruciferae, in het onderzoek kon worden betrokken.

Naar hun elektronenmicroscopisch voorkomen zijn zowel staafvormige, draadvormige als bolvormige virussen vertegenwoordigd. Bij de fysisch-chemische eigenschappen is vooral gedacht aan die, voortvloeiend uit de diverse nucleïnezuur/eiwitverhouding in de virussen. Daarnaast is ook rekening gehouden met de – mogelijk door fysisch-chemische bijzonderheden in de bouw bepaalde – eigenschap van sommige virussen om hetzij uitsluitend, hetzij facul-

TABEL 1. Namen der bij het onderzoek betrokken virussen en enige hunner eigenschappen.

Namen der virussen / *Names of viruses*			Vorm der virussen *Virus shape*	
Triviale naam *Popular name in use in the Netherlands*	Volg. nomencl. van Smith[1]) 1937 *Acc. to nomenclature of Smith[1]) 1937*	Afgekort *Abbreviated*		
tabaksmozaiekvirus	Nicotiana virus 1	T.M.V.	staafje	*rodlike*
ratelvirus	Nicotiana virus 5	R.V.	staafje	*rodlike*
stoppelknolvirus[8])	Brassica virus 1	S.K.V.[8])	–	–
X-virus	Solanum virus 1	X.V.	draadje	*thread-like*
witteklavervirus	–	W.K.V.[11])	draadje	*thread-like*
Phaseolus virus 1	Phaseolus virus 1	P.V.1.	lange draden	*long threads*
Phaseolus virus 2	Phaseolus virus 2	P.V.2	idem	*do*
luzernemozaiekvirus	Medicago virus 2	L.M.V.	bolletje	*spherical*
tabaksnecrosevirus	Nicotiana virus 11	T.N.V.	bolletje	*spherical*
ringspot virus	Nicotiana virus 12	R.S.V.	bolletje	*spherical*
bushy stunt virus	Lycopersicum virus 4	B.S.V.	bolletje	*spherical*
komkommermozaiekvirus, gele stam no. 6 van PRICE[21])	Cucumis virus 1 – *yellow strain no. 6 – PRICE*[21])	K.M.V.	bolvormig?	*spherical?*
aspermy virus st. chrysanthemum	cucumis virus 1 str. chrysanthemum	A.S.V.	–	–
anjermozaiekvirus	Dianthus virus	A.M.V.	bolletje	*spherical*

[1]) SMITH, K. M., 1937. A textbook of plant virus diseases. J. &. A. Churchill Ltd, London.
[2]) Tenzij anders vermeld, ontleend aan SMITH, K. M., 1957. 2e ed. van [1]).
Unless otherwise stated derived from Smith, K. M., 1957. 2nd ed. from [1]).
[3]) Zie onder andere – *See among others:* RAGETLI, H. W. J., C. VAN DER SCHEER & J. P. H. VAN DER WANT, 1955. T. Pl.ziekten 61: 35–46.
[4]) SCHRAMM, G. & H. DANNENBERG, 1944. Ber. Chem. Ges. 77: 53–60.
[4a]) Berekend uit gegevens van STANLEY, W. M., door SCHRAMM, G. (16) – *using data of Stanley, W. M., calculated by Schramm, G. (16).*
[5]) Zie onder andere [4]) - *See among others* [4]).
[6]) WANT, J. P. H. VAN DER & A. ROZENDAAL, 1948. T. Pl.ziekten 54: 134–141.
[7]) WANT, J. P. H. VAN DER, 1952. Proc. Conf. Potato Virus Diseases, Wageningen-Lisse 1951: 71–75.
[8]) BEEMSTER, A. B. R., 1957. T. Pl.ziekten 63: 1–12.
[9]) BAWDEN, F. C. & N. W. PIRIE, 1938. Brit. J. exp. Path. 19: 66–82, afgeleid van een P-gehalte van 0,4–0,5% - *derived from a P-content of 0.4–0.5%.*
[10]) LORING, H. S., 1938. J. biol. Chem., 126: 455–478.
[11]) WANT, J. P. H. VAN DER, 1954. Dissertatie - *thesis*, Wageningen.
[12]) BRANDES, J. & L. QUANTZ, 1955. Naturw. 42: 588–589.
[13]) ROSS, A. F., 1941. Phytopath. 31: 394–410.
[14]) LEONARD, B. R. Jr., J. W. ANDEREGG, S. SHULMAN, P. KAESBERG & W. W. BEEMAN, 1953. Biochim. biophys. Acta 12: 499–507.

tatief door luizen te worden overgebracht. De in het onderzoek opgenomen facultatief door luizen over te brengen virussen zijn als zodanig in tabel 1 aangeduid.

Op grond van de verscheidenheid van de gekozen virussen, scheen de verwachting gewettigd, dat, indien voor de anjerremstof ongevoelige virussen zouden voorkomen, een of meer hiervan ook inderdaad opgespoord zouden worden.

Table 1. Names and some properties of the viruses studied.

neting in mμ *Size in mμ*	Nucleïnezuur-gehalte in % *Nucleic acid content in %*	Mol. gew. x 10 ^{6} *Mol. weight* x 10^{-6}	Facultatief door luis over te bren-gen *Facultatively transmiss. by aphids*	Tijd waarin de infectieuziteit van virushoudende plantesappen bij kamertemperatuur bewaard blijft[2]) *Longevity of virus activity in plant saps kept at room temperature*[2])	
280 × 15[3])	4,9[4]); 5,6 [4a])	40,7[5])	niet *not*	minder dan 1 mnd.	*less than one month.*
250 × 20[6])	–	–	niet *not*	minder dan 1 mnd.[7])	*do*[7])
–	–	–	wel *yes*	2–3 dagen[8])	*2–3 days*[8])
295[3])	ca. 6[9])	ca. 20[10])	niet *not*	enige weken	*some weeks*
(0–960) × 20[11])	–	–	moeilijk[11]) *difficult*[11])	meer dan 3 d.[11])	*more than 3 days*[11])
(0–780) × 15[12])	–	–	wel *yes*	2 dagen[11])	*2 days*[11])
(0–780) × 15[12])	–	–	wel *yes*	1 dag[11])	*1 day*[11])
16,5[13])	ca. 15[13])	2,1[13])	wel *yes*	3 dagen	*3 days*
27[3]); 28[14])	18[15])	ca. 8[16])	niet *not*	minder dan 20 dagen	*less than 20 days*
19[17]); 26[18])	34,4–40[17])	3,4[17])	? ?	8 dagen [24])	*8 days* [24])
29[3]); 30,9[14])	17[19])	10,6[20])	niet *not*	3 dagen	*3 days*
35[22])	–	–	wel *yes*	72–96 uur	*72–96 hours*
–	–	–	wel *yes*	24 uur	*24 hours*
35[23])	–	–	niet *not*	–	–

[5]) Door SCHRAMM, G. (16) afgeleid van een P-gehalte van 1,7–2%, bepaald door BAWDEN & PIRIE (15a) - *calculated by Schramm, G. (16) from a P-content of 1.7–2% as assayed by Bawden & Pirie (15a).*

[15a]) BAWDEN, F. C. & N. W. PIRIE, 1945. Brit. J. exp. Path. 26: 277–285.
[16]) SCHRAMM, G., 1954. Die Biochemie der Viren, Springer Verlag, Berlin.
[17]) STANLEY, W. M., 1939. J. biol. Chem. 129: 405–428.
[18]) STEERE, R. L., 1956. Phytopath. 46: 60–69.
[19]) STANLEY, W. M., 1940. J. biol. Chem. 135: 437–454.
[20]) NEURATH, H. & G. R. COOPER, 1940. J. biol. Chem. 135: 455–462.
[21]) PRICE, W. C., 1934. Phytopath. 24: 743–761.
[22]) SILL, W. H. Jr. W. C. BURGER, M. A. STAHMANN & J. C. WALKER, 1952. Phytopath. 42: 420-422.
[23]) Eigen waarneming (foto 3) – *own observation (photograph 3).*
[24]) STANLEY, W. M. & R. W. G. WYCKOFF, 1937. Science 85: 181–183.

Opmerking:
Uit deze compilatie blijkt hoe spaarzaam de gegevens over fysisch-chemische eigenschappen der virussen zijn. De gepubliceerde gegevens zijn veelal met indirecte bepalings-methoden verkregen.

Remark
This compilation shows how sparce the data on physico-chemical properties of viruses are. The published data have often been obtained by indirect methods.

In tabel 2 is aangegeven op welke waardplanten de verschillende virussen in aanwezigheid van de anjerremstof werden getoetst.

Waardplanten.

Het schema van de te toetsen waardplanten werd zodanig opgesteld, dat een aanzienlijk aantal plantenfamilies, behorende tot verschillende orden in het

onderzoek werden betrokken. Hierbij werd uiteraard rekening gehouden met de vraag of de gekozen planten in voldoende aantal en in geschikte toestand ter beschikking zouden kunnen staan, terwijl ook werd gelet op de vorm en de grootte der bladeren. Zoveel mogelijk werden die planten ingelast, die uit de literatuur als waardplant voor een of meer virussen bekend zijn. Hoofdzakelijk is gewerkt met waardplanten, die op de virusinfectie met een lokale reactie reageren, zodat de infectieuziteit van een virusoplossing in aantallen vlekken kan worden weergegeven.

Zoals uit 2.1. van dit hoofdstuk is gebleken, werd aanvankelijk vooral aandacht besteed aan de reactie van toetsplanten op anjermozaiekvirus, dat in zijn natuurlijke milieu naast de inhibitor voorkwam. Daarom werden de verschillende plantesoorten uit het schema, voor zover ze niet reeds als waardplanten voor anjermozaiekvirus waren beschreven, allereerst getoetst op hun reactie tegenover dit virus. Dit onderzoek leverde enkele interessante nieuwe waardplanten op. Later werden deze waardplanten, voorzover ze niet reeds als waardplant van enkele andere in het onderzoek te betrekken virussen waren beschreven, ook op hun reactie tegen die virussen getoetst. Ook werden nog enkele andere

TABEL 2. Waardplanten en virussen betrokken bij het onderzoek naar de werking van de inhibitor uit anjer.

Waardplanten / *Hosts*			
Orde / *Order*	Familie / *Family*	Geslacht / *Genus*	Soort / *Species*
Centrospermae	Caryophyllaceae	Dianthus	caryophyllus
		Dianthus	barbatus
	Chenopodiaceae	Chenopodium	quinoa
		Spinacea	oleracea
	Phytolaccaceae	Phytolacca	esculenta
	Amaranthaceae	Gomphrena	globosa
		Amaranthus	retroflexus
Leguminosae	Papillionaceae	Phaseolus	vulgaris
		Vicia	faba
		Vigna	sinensis
Personatae	Solanaceae	Nicotiana	tabacum var. White Burley
		Nicotiana	glutinosa
		Solanum	lycopersicum
	Scrophulariaceae	Antirrhinum	majus
Cucurbitales	Cucurbitaceae	Cucumis	sativus
Rhoeadales	Cruciferae	Brassica	oleracea var. botrytis
		Sinapis	alba
		Matthiola	incana
Synandrae	Compositae	Callistephus	chinensis
		Helianthus	annuus

[1]) Voor de betekenis van de gebruikte afkortingen zie tabel 1, p. 252 en 253.
[2]) × betekent, dat de plant met spreidsymptomen reageert of, dat de kwantitatieve waardering der proeven op deze symptomen is gebaseerd.
[3]) + betekent, dat de plant met lokale symptomen reageert of, dat de kwantitatieve waardering der proeven op deze symptomen is gebaseerd.
[4]) ( ) betekent dat de betreffende plantesoort voor het eerst als waardplant voor dit virus is gebruikt. Voor de beschrijving der symptomen zie Addendum I.

plantesoorten uit het schema op hun reactie tegenover deze laatste virussen onderzocht.

Gegevens over niet eerder beschreven of slechts zeer onvolledig aangeduide reacties van plantesoorten op hieronder te noemen virussen, zullen in Addendum I worden weergegeven. Een overzicht van de uiteindelijk gebruikte waardplanten en de getoetste virussen wordt, zoals reeds eerder gezegd, in tabel 2 gegeven.

3. METHODIEKEN

Winning der virus- en remstofhoudende oplossingen

Als bron voor de verschillende virussen werd gebruik gemaakt van bladeren, eventueel ook bladstelen of stengeldelen, van planten die, indien besmet met het betreffende virus, dit in een aanzienlijk gehalte synthetiseren. Voor verdere gegevens, zie tabel 3.

able 2. Hosts and viruses involved in the study on the action of the inhibitor from carnation.

	Virussen[1]) / *Viruses*[1])												
M.V.	R.V.	R.S.V.	B.S.V.	S.K.V.	T.M.V.	X.V.	W.K.V.	P.V. 1	P.V. 2	T.N.V.	K.M.V.	A.S.V.	L.M.V.
×[2])													
×)[3, 4])	(+) ×	(+)	(+)	(+)									
+)	+	+											
+	+	+	(+)	+ (+)									
+		+ + +					×	×	×	+			+
←	+	+	+ +	+						+	×	×	+
	+		+ ×	×	+	+					×	×	
		+ +											
·)	+	+	+										
				× ×									
+				(×)									

[1]) *Names of viruses abbreviated according to table 1, p. 252 and 253.*

[2]) × *means that the action of the virus on the host is systemic, or that the quantitatieve estimation of the results is based on this type of reaction.*

[3]) + *means that the virus causes local lesions on the host, or that the quantitative estimation of the results is based on this type of reaction.*

[4]) ( ) *indicates that this species is a new host plant for the virus concerned. Symptoms are described in Addendum I.*

TABEL 3. Als virusbron gebruikt plantemateriaal
Table 3. Plants and parts thereof used as source for the viruses examined

Naam virus *Name of virus*	Afgekort[1]) *Abbreviated*[1])	Virusbron *Virus source*	
		Planten *Plants*	Uitgeperste plantedelen *Squeezed plant parts*
anjermozaiekvirus	A.M.V.	Phaseolus vulgaris	enkelvoudige bladeren met primaire symptomen *primary inoculated leaves*
aspermy virus	A.S.V.	Nicotiana glutinosa	bladeren *leaves*
bushy stunt virus	B.S.V.	Lycopersicum esculentum	bladeren, bladstelen en stengeldelen *leaves, petioles and parts of the stem*
komkommermozaiekvirus	K.M.V.	Nicotiana glutinosa	bladeren *leaves*
luzernemozaiekvirus	L.M.V.	Nicotiana tabacum[2])	bladeren, zowel primair als systemisch geïnfecteerde *inoculated as well as systemically infected leaves*
Phaseolus virus 1	P.V. 1	Phaseolus vulgaris	bladeren, bladstelen en jonge spruiten *leaves, petioles and sprouts*
Phaseolus virus 2	P.V. 2	Phaseolus vulgaris	Bladeren, bladstelen *leaves, petioles*
ratelvirus	R.V.	Nicotiana tabacum	bladeren met primaire symptomen *inoculated leaves with primary symptoms*
ring spot virus	R.S.V.	Nicotiana tabacum	bladeren met primaire symptomen *leaves with primary symptoms*
stoppelknolvirus	S.K.V.	Petunia hybrida	bladeren, systemisch geïnfecteerd *systemically infected leaves*
tabaksmozaiekvirus	T.M.V.	Nicotiana tabacum	bladeren *leaves*
tabaksnecrosevirus	T.N.V.	Phaseolus vulgaris	enkelvoudige bladeren met primaire symptomen *primary inoculated leaves*
witteklavervirus	W.K.V.	Phaseolus vulgaris	bladeren, bladstelen en jonge spruiten *leaves, petioles and sprouts*
X-virus	X.V.	Nicotiana glutinosa	bladeren *leaves*

[1]) Zie ook tabel 1 p. 252 en 253.
Abbreviated according to table 1 p. 252 and 253.
[2]) Steeds werd de variëteit White Burley gebruikt.
The variety White Burley has always been used.

Het benodigde materiaal werd (tenzij anders vermeld) onmiddellijk voor de proeven geoogst. De verse plantedelen werden fijngemaakt in een mortier en door kaasdoek uitgeperst. Uitgaande van dit onbehandelde plantesap werden met behulp van dubbel gedestilleerd water de verschillende verdunningen van het virus gemaakt.

Het benodigde anjersap werd verkregen door in diepvries bewaarde gezonde anjerspruiten in een mortier fijn te maken, gevolgd door uitpersing van

het fijngemaakte materiaal door kaasdoek. Tenzij anders vermeld, werd bij iedere proef vers uitgeperst anjersap gebruikt. In enkele proeven werd gewerkt met een volgens het vries-droogproces verkregen concentraat van anjersap, dat vooraf bij laag toerental helder was gecentrifugeerd (1 h bij gem. 11.000 *g*). Tijdens dit droogproces sublimeerde het water in het bevroren sap bij lage druk (ca. 0,5 mm kwikdruk) tegen een door een mengsel van vast koolzuur en ether gekoeld oppervlak. Om het drogen te versnellen werd via een capillair een N_2-stroom boven het bevroren sap ingeleid. Bij het afbreken van het sublimatieproces werd het toestel met N_2 gevuld.

Zoals in II.2.1. al even werd aangeduid, werden in de proeven de verschillende verdunningen van de virushoudende sappen gemengd met een gelijk volume gezond anjersap, respectievelijk water. Zowel de menging met anjersap als de menging met water geschiedde onmiddellijk voor de uitvoering der inoculaties. Tot zolang werden de sappen en de verdunningen hiervan bewaard bij 0°C.

Het inoculeren

De organen, waar het virus ingebracht diende te worden, werden vooraf licht met carborundumpoeder (grofte 500) bestrooid. Vervolgens werd met de vinger, die in de virusoplossing was gedoopt, zacht en op een regelmatige wijze over het bestrooide oppervlak gestreken, totdat dit geheel was bevochtigd. Direct daarna werd het ingewreven orgaan voorzichtig met leidingwater afgespoeld. Teneinde het inwrijven van de virusoplossingen zo uniform mogelijk te doen verlopen, werden alle inoculaties door dezelfde persoon uitgevoerd.

Vergelijking van toets en controle

De manier waarop toets en controle met elkaar konden worden vergeleken, werd bepaald door een tweetal factoren:

a. de reactie van de toetsplant op het betreffende virus;
b. de morfologische geaardheid van de toetsplant.

Zoveel mogelijk is gewerkt met waardplanten, die op de virusinfectie met een lokale reactie reageren. In deze gevallen was het mogelijk toets en controle op een en dezelfde plant te vergelijken. Hierbij werd ernaar gestreefd de beide oplossingen op die plantedelen te onderzoeken, die zowel naar vorm als naar fysiologische toestand grote gelijkenis vertonen.

Waar dit naar de vorm en grootte der bladeren mogelijk was, is gewerkt op helften van hetzelfde blad. Tenzij afzonderlijk vermeld, zijn dan de gewone bladeren van de plant gebruikt en is om het bevochtigen van een bladhelft door de verkeerde inoculatievloeistof te voorkomen over de middennerf een laagje vaseline uitgestreken. De bladeren werden namelijk in het algemeen niet afgesneden, maar aan de plant geïnoculeerd.

Bij planten, die dank zij bijzondere morfologische eigenschappen identieke organen bezitten, die bovendien doeltreffend reageren op de virusinfectie, is daarvan een dankbaar gebruik gemaakt. Zo werden bijvoorbeeld bij *Gomphrena globosa* toets en controle steeds vergeleken op de twee bladeren van hetzelfde juk. Bij *Phaseolus vulgaris* en *Vigna sinensis* werden steeds de beide eerste, enkelvoudige bladeren gebruikt, terwijl bij *Cucumis sativus* de resultaten op de cotylen werden vergeleken. Voor verdere bijzonderheden aangaande de geïnoculeerde organen, zie tabel 4.

Bij planten, die op de virusinfectie niet lokaal reageren, maar een algemeen ziektebeeld vertonen (zie tabel 2), moesten toetsvloeistof en controle-vloeistof uiteraard op verschillende planten worden uitgestreken.

TABEL 4. Organen of delen hiervan, die bij de verschillende toetsplanten werden geïnoculeerd.
Table 4. Organs or parts of these from different test plants inoculated.

Toetsplant *Test plant*	Bij lokale reactie	*In case of local reaction*	Bij spreidsymptomen	*In case of systemic infection*
Antirrhinum majus	tegenoverstaande bladeren	*opposite leaves*		
Amaranthus retroflexus	bladhelften	*half leaves*		
Brassica oleracea			cotylen en bladeren	*cotyledons and leaves*
Callistephus chinensis	bladeren	*leaves*		
Chenopodium quinoa	bladhelften	*half leaves*		
Cucumis sativus	cotylen	*cotyledons*		
Dianthus barbatus			bladeren	*leaves*
Dianthus caryophyllus			cotylen en bladeren	*cotyledons and leaves*
Gomphrena globosa	tegenoverstaande bladeren	*opposite leaves*		
Helianthus annuus			cotylen	*cotyledons*
Matthiola incana			bladeren	*leaves*
Nicotiana glutinosa	bladhelften	*half leaves*	bladeren	*leaves*
Nicotiana tabacum	bladhelften	*half leaves*	bladeren	*leaves*
Phaseolus vulgaris	enkelvoudige bladeren	*primary leaves*	enkelvoudige bladeren	*primary leaves*
Phytolacca esculenta	bladhelften	*half leaves*		
Sinapis alba			cotylen en bladeren	*cotyledons and leaves*
Solanum lycopersicum			cotylen en bladeren	*cotyledons and leaves*
Spinacea oleracea			bladeren	*leaves*
Vicia faba	bladeren van een juk	*opposite leaflets of the pinnate leaves*		
Vigna sinensis	enkelvoudige bladeren	*single leaves*		

Gegevens over de geaardheid, die het te toetsen plantemateriaal diende te hebben om een geschikte reactie met de verschillende virussen op te leveren, worden voor zover nodig in Addendum I vermeld.

4. PROEVEN

4.1. Uitvoering

Uiteindelijk geschiedden alle proeven volgens onderstaand schema, dat terloops al in II.2.1. werd aangeduid.

Ieder rechthoekje geeft de samenstelling van een toetsvloeistof aan (de virus- en remstofhoudende oplossingen werden in gelijke volumedelen gemengd). De controle-vloeistof werd steeds verkregen door de betreffende virusverdunning met een gelijk volume water te mengen. Voor de wijze, waarop de uitgangsvloeistoffen, zowel virus- als remstofhoudende, werden verkregen, zie II.3. Afhankelijk van de ter discussie gestelde vraag diende een groter of kleiner

inhibitor / virus	geconcentr.	onverdund	10^{-1} verdund	10^{-2} verdund
Onverdund				
10^{-1} verdund				
10^{-2} verdund				
10^{-3} verdund				
10^{-4} verdund				

deel van het weergegeven schema te worden uitgewerkt. Zo werd in de experimenten, waarbij de reactie van uiteenlopende virussen op de anjerinhibitor werd nagegaan, slechts onbehandeld sap en sap in de verdunning 10^{-1} gebruikt, terwijl ook alleen met de oorspronkelijke virusoplossingen, of de verdunning 10^{-1} hiervan, hoefde te worden gewerkt. Dit laatste vond achteraf zijn verklaring hierin, dat *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa* en *Phaseolus vulgaris*, voor de inhibitor bijzonder gevoelige waardplanten zijn. Bij de proeven, waarbij de gevoeligheid van verschillende waardplanten voor de inhibitor bij gebruik van hetzelfde virus werd onderzocht, werden ook de hogere virusverdunningen gebruikt. In die gevallen, waarbij vooral de betekenis van de inhibitorconcentratie voor de virusremming werd nagegaan, werden zowel de lagere inhibitorconcentraties als, bij bepaalde waardplanten ook de geconcentreerde remstofoplossing gebruikt. Soms werden deze twee typen van proeven, waarvan de resultaten zijn weergegeven in de tabellen 6 en 7, gecombineerd. De activiteit van elke toetsvloeistof werd, op een enkele uitzondering na, steeds in minimaal 5 herhalingen met die van de corresponderende controle-vloeistof vergeleken (zie Addendum II).

Daar de experimenten, die dienden om bij gebruik van een bepaald virus de gevoeligheid van een groter aantal uiteenlopende waardplanten voor de anjerinhibitor vast te stellen, het meest uitgebreide karakter droegen (zie tabel 6), zal dit type hier besproken worden. De uitvoering van de beide andere typen van proeven kan door vereenvoudiging hieruit worden afgeleid.

Om verschillende plantesoorten, bij toetsing met een bepaald virus, naar hun gevoeligheid voor de anjerinhibitor te kunnen vergelijken, dienen zij te worden geïnoculeerd met respectievelijk toets- en controle-oplossingen, die volkomen dezelfde samenstelling hebben. Vooral met het oog op mogelijke schommelingen van het virusgehalte in het uitgangsmateriaal, was het geboden de verschillende toets- en controle-oplossingen van dezelfde uitgangsvloeistof te maken. Omdat de activiteit van virushoudend perssap tijdens het bewaren verandert dienden alle inoculaties, indien enigszins mogelijk, op dezelfde dag te geschieden. Dit was te meer wenselijk, daar dan de verschillende planten na de inoculatie onder dezelfde omstandigheden van temperatuur en licht verbleven.

Deze wijze van uitvoering der proeven bracht mee, dat planten met zeer uiteenlopende snelheid van ontwikkeling, op hetzelfde tijdstip en in het juiste groeistadium beschikbaar moesten zijn. De hieraan verbonden moeilijkheden, en de beschikking over een zeer beperkte kasruimte, maakten de voorbereidingen

dezer proeven tot een spannende aangelegenheid. Bij de proeven waren steeds minstens zeven verschillende plantesoorten tegelijk betrokken (zie tabel 2). Afhankelijk van de gevoeligheid van een plantesoort voor het te toetsen virus, werden ook de hogere verdunningen hiervan uitgestreken. In het algemeen werden geen verdunningen van de virushoudende uitgangsvloeistof beneden 10^{-3} gebruikt. Het totale aantal planten, dat per proef bij vier verschillende experimenten werd gebruikt, lag tussen 98 en 140. Bij een vijfde proef met S.K.V. waren het zelfs 345 planten.

De grote variatie in de aantallen planten per proef was vooral het gevolg van twee factoren, namelijk:

a. de wijze van reageren van de toetsplanten op het betreffende virus, te weten met lokale reactie dan wel met zogenaamde spreidsymptomen (zie tabel 2);
b. de mate, waarin bij een lokale reactie meer dan één blad per plant voor toetsing geschikt was.

Verder speelde natuurlijk ook de uitgebreidheid van de te toetsen verdunningsreeksen per plantesoort een rol.

Van de waardplanten *Gomphrena globosa*, *Chenopodium quinoa* en *Phytolacca esculenta* werden in de proeven steeds verschillende bladeren per plant gebruikt. Van White Burley tabak daarentegen werd vanwege de grote verschillen tussen de diverse bladeren bij jonge planten, steeds maar één blad per plant gebruikt. Bij de bladhelften-toets, waarbij de bladeren aan de plant bleven werd steeds dezelfde helft, namelijk de rechter, gezien van de bladtop naar de hoofdas van de plant, gebruikt voor het uitwrijven van de controle-vloeistoffen.

Alle te beproeven planten werden steeds achter elkaar met een bepaalde toets- of controle-vloeistof behandeld. Alle inoculaties in een bepaalde proefserie werden dus met dezelfde vloeistof verricht, terwijl, zoals gezegd, de menging van de verschillende virusverdunningen met respectievelijk een gelijk volume anjersap of water plaats vond onmiddellijk vóór de uitvoering van die proefserie.

Het tijdsverloop tussen het inoculeren van de eerste en de laatste plant van een proefserie was gemiddeld 10 tot 15 minuten. De volgorde, waarin de diverse plantesoorten na elkaar werden geïnoculeerd was niet willekeurig. Van sommige gebruikte soorten is namelijk uit de literatuur bekend, dat zij zelf ook stoffen bevatten, die in mindere of meerdere mate de virusinfectie remmen. Zo wordt voor sap van komkommer (Fulton, 1943; Gendron & Kassanis, 1954), *Chenopodium spec.* (Manil, 1947), spinazie (Kuntz & Walker, 1947; Kassanis & Kleczkowski, 1948), Phytolacca (Kassanis & Kleczkowski, 1948; Gendron & Kassanis, 1954) het voorkomen van dergelijke actieve stoffen aangegeven.

Hoewel de gegevens van de verschillende auteurs (zie vooral Kassanis & Kleczowski, 1948 en Gendron & Kassanis, 1954) niet volledig vergelijkbaar zijn, kan hieruit toch worden afgeleid, dat de werkzaamheid van de sappen, vermoedelijk in de volgorde waarin ze hierboven zijn aangegeven, toeneemt. Indien deze soorten in één proef voorkwamen, werden ze dan ook na de andere planten, in volgorde komkommer, Chenopodium, spinazie en Phytolacca behandeld. Hierdoor werd voorkomen, dat wanneer eventueel door het inoculeren sporen van de werkzame stoffen uit die planten in de inoculatievloeistof zouden komen, deze enige invloed van betekenis op de resultaten, speciaal op de controles, zouden kunnen uitoefenen.

Voor de telling der lokale vlekken werden de geïnoculeerde bladeren van de planten gehaald en bij doorvallend licht doorgaans met het blote oog bekeken. Als de necrotische vlekken zeer klein waren, werden zij met behulp van een binoculair geteld.

4.2. Resultaten

Aard en bepalingswijze van de grootheid, waarin het effect is uitgedrukt.

De grootheid, waarin het effect van de werkzaamheid van de anjerinhibitor is uitgedrukt, zouden wij het activiteitspercentage willen noemen.

Bij proeven, waarbij de toetsplanten op de virusinfectie met lokale symptomen reageren, kan het activiteitspercentage worden gedefinieerd als het gemiddelde activiteitsquotiënt van een proefserie × 100. Onder activiteitsquotiënt wordt dan verstaan de verhouding van:

$$\frac{\text{aantallen vlekken van de toets}}{\text{aantallen vlekken van de controle}}$$

per blad, per identiek bladpaar of per cotylenpaar.

Door bij de berekening van het activiteitspercentage gebruik te maken van het gemiddelde activiteitsquotiënt per proefserie, dit is de som der quotiënten/het aantal herhalingen, kan de eigen geaardheid van ieder blad, respectievelijk bladpaar of cotylenpaar, met betrekking tot de gevoeligheid voor de remstof zich ten volle doen gelden. Indien niet *alle* activiteitsquotiënten van een proefserie kleiner dan 1 zijn, is met behulp van de symmetrietoets van WILCOXON (BENARD c.s., 1956) nagegaan, of de aantallen vlekken van de toetsen en de controles al of niet symmetrisch liggen ten opzichte van een gemiddeld aantal.[1]) Blijkt de rangschikking inderdaad symmetrisch te zijn, dan moet hieruit worden geconcludeerd, dat de gevonden verschillen tussen toets en controle niet reëel zijn (dus ook al zijn de gesommeerde resultaten per proefserie kleiner dan de corresponderende gesommeerde controles) en is het activiteitspercentage op 100 gesteld. Als onbetrouwbaarheidsdrempel is 0,03 aangehouden, dat wil zeggen, dat er een kans bestaat van 3 % dat ten onrechte is geconcludeerd, dat de proefresultaten systematisch kleiner zijn dan de resultaten der controles. Dit houdt in, dat bij vijf herhalingen geen enkele toetswaarde groter mag zijn dan de corresponderende controle, terwijl bij zes waarnemingen één toets groter mag zijn dan de corresponderende controle, mits dit negatieve verschil kleiner is dan elk der vijf andere positieve verschillen.

Wanneer de getoetste planten op de virusinfectie met spreidsymptomen reageren is het activiteitspercentage gelijk aan het activiteitsquotiënt × 100. Onder activiteitsquotiënt wordt in dit geval de verhouding verstaan:

$$\frac{\text{aantallen zieke planten per toetsserie}}{\text{aantallen planten per toetsserie}} \Big/ \frac{\text{aantallen zieke planten per controle-serie}}{\text{aantallen planten per controle-serie}}$$

Indien dit quotiënt groter is dan 1, is het activiteitspercentage op 100 gesteld.

[1]) Schrijver wil hier gaarne dank zeggen aan Ir. L. C. A. CORSTEN, hoofd van de afdeling Wiskunde van het Instituut voor Rassenonderzoek te Wageningen, voor het door hem in deze gegeven advies.

Gevonden activiteitspercentages.

Zoals reeds in paragraaf 4.1. van dit hoofdstuk werd aangegeven, kunnen de uitgevoerde proeven in drie groepen worden gerangschikt. De eerste groep omvat die proeven, waarbij de reactie van een negen-tal verschillende virussen op de anjerinhibitor werd nagegaan, bij toetsing op slechts drie verschillende waardplanten. De uit deze proeven resulterende activiteitspercentages zijn weergegeven in tabel 5. Voor de verklaring van de hierin voorkomende afkortingen der getoetste virussen, zie tabel 1.

TABEL 5. Activiteitspercentages van mengsels van virushoudende plantesappen en sap van gezonde anjers, bepaald op drie verschillende plantesoorten.
Table 5. Activity percentages from mixtures of virus-containing plant juices and sap from healthy carnation plants as determined on three different hosts.

Toetsplant *Test plant*	Phaseolus vulgaris			Nicotiana tabacum			Nicotiana glutinosa		
Kolom nummer *Column No.*	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Virus [1])									
T.M.V.*							7,6	0,0	0,0
X.V.*								8,2	0,5
W.K.V.*		0,0	0,0						
P.V. 1*	37,5	0,0	0,0						
P.V. 2*	0,0	0,0	0,0						
L.M.V.°		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
T.N.V.°				15,4	1,2	0,0			
K.M.V.°				100	0,0	0,0	57,1	0,0	0,0
A.S.V.°				42,9	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0

Alle met * gemerkte virussen zijn met sap afkomstig van anjerplanten van dezelfde partij gemengd, de met ° gemerkte virussen met sap van een andere voorraad.
*Viruses marked with * are mixed with sap from the same stock of carnation plants, those marked with ° with sap from another stock of plants.*

Kolom 1: activiteitspercentages van mengsels van gelijke volumedelen onverdund virushoudend sap en 10^{-1} verdund sap van gezonde anjers.
Kolom 2: idem en onverdund anjersap.
Kolom 3: idem 10^{-1} verdund virushoudend sap en onverdund anjersap.

Column 1: activity percentages from mixtures containing equal volumes of undiluted virus-containing plant juices and 10^{-1} diluted sap of healthy carnation plants.
Column 2: do and undiluted carnation sap.
Column 3: do 10^{-1} diluted virus solution and undiluted carnation sap.

[1]) Voor de betekenis van de gebruikte afkortingen zie tabel 1 p. 252 en 253.
Names of viruses abbreviated according to table 1 p. 252 and 253.

De tweede groep omvat de proeven, waarbij een vijf-tal verschillende virussen in tegenwoordigheid van de anjerinhibitor elk op zeven of meer onderscheiden waardplanten werden getoetst. De activiteitspercentages, die in deze proeven werden gevonden, zijn weergegeven in tabel 6, blz. 264. Behalve de activiteitspercentages van de mengsels, verkregen door samenvoeging van gelijke volumedelen virusoplossing en onverdund anjersap, zijn hierin ook opgenomen de bij verschillende toetsplanten bepaalde activiteitspercentages van de mengsels virusoplossing – 10^{-1} verdund anjersap (kolommen 1).

Om ook een absolute maatstaf voor de virusactiviteit in de toetsmengsels en de controlemengsels te geven, zijn in Addendum II.1 voor die proefseries uit

tabel 6, waarbij lokale symptomen voorkwamen, de gemiddelde aantallen vlekken van toets en controle weergegeven.

De derde groep omvat de proeven, waarbij de invloed van de inhibitorconcentratie op de grootte der activiteitspercentages werd nagegaan. In deze groep kunnen weer twee typen van experimenten worden onderscheiden, namelijk die, waarbij onbehandeld anjersap en verdunningen hiervan zijn gebruikt en die, waarbij naast onbehandeld anjersap, sap is gebruikt dat door middel van het vries-droogproces 5 tot 8 maal is geconcentreerd.

De resultaten van de proeven van het eerste type zijn gerangschikt in tabel 7, blz. 266, die van het tweede type in tabel 8, blz. 267 (zie ook Addendum II).

Men diene bij het beoordelen der activiteitspercentages te bedenken, dat sommige betrekking hebben op virussen, die op de betreffende waardplant met zogenaamde spreidsymptomen reageren (zie tabel 2). Eén zieke plant uit een dergelijke toetsserie kan theoretisch overeenkomen met één vlek uit een toetsserie, waarvan de plant met lokale symptomen reageert. Het is daarom begrijpelijk, dat daar waar het virus met spreidsymptomen reageert, de activiteitspercentages de neiging hebben groter te zijn dan bij lokale reactie.

4.3. Analyse der verkregen resultaten en conclusies

Bij een nadere beschouwing van de in de tabellen 5 tot en met 8 weergegeven proefresultaten, kunnen de volgende conclusies worden geformuleerd:

a. Onder de veertien getoetste virussen komt blijkens de gevonden activiteitspercentages geen enkel virus voor, dat voor de anjerinhibitor ongevoelig is (zie tabellen 5 en 6). Men lette, voor wat tabel 6 betreft, vooral op de activiteitspercentages, zoals die van de verschillende virussen in aanwezigheid van anjersap op de *Nicotiana*-soorten en *Phaseolus vulgaris* werden bepaald. De in beide tabellen aangegeven activiteitspercentages van de mengsels, onverdund anjersap-virusoplossing van verschillende concentraties (de kolommen 2 en hoger), zijn voor deze plantesoorten namelijk zeer laag tot 0, terwijl zelfs de mengsels van onverdunde virusoplossing-anjersap 10^{-1} verdund, ten dele vrij lage activiteitspercentages te zien geven.
b. Omtrent het al of niet bestaan van een kleine specifieke invloed van het virus op de grootte van het activiteitspercentage bij een zelfde waardplant (zie tabel 9) kan niets met zekerheid worden gezegd, daar de absolute virusgehalten van de toetsvloeistoffen niet bekend waren.
c. De gevoeligheid van de verschillende plantesoorten voor de anjerinhibitor, zoals die blijkt uit de relatie van het infectievermogen van eenzelfde virus-anjersapmengsel en eenzelfde controlemengsel op deze planten, is zeer uiteenlopend (zie tabel 6, vooral de kolommen 2 en 3). Duidelijk blijkt hier, dat naast de gevoelige soorten als *Phaseolus vulgaris*, de *Nicotiana*-soorten, *Cucumis sativus* en verschillende Cruciferae, die zeer lage activiteitspercentages opleveren, soorten voorkomen, die slechts matig of weinig gevoelig zijn, bij voorbeeld: *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa* en *Phytolacca esculenta*.
d. De gevoeligheid van de verschillende waardplanten voor de anjerinhibitor blijkt voor zeer uiteenlopende virussen van gelijke orde te zijn (zie tabel 6, vooral de kolommen 2).
Ter verduidelijking diene onderstaande tabel 9, waarin een aantal van de waarden uit tabel 6 opnieuw zijn gerangschikt.

TABEL 6. Activiteitspercentages van mengsels bestaande uit gelijke volumedelen virushoudende plantesappe of verdunningen hiervan, en onverdund of verdund (kolommen 1) sap van gezonde anjerplante zoals zij voor eenzelfde virus gelijktijdig op uiteenlopende plantesoorten werden bepaald.**)

Naam virus / *Name of virus*	Anjermozaiekvirus* A.M.V.[1])*						Bushy stunt virus* B.S.V.[1])*				
Kolom no. / *Column no.*	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
Verdunn. virushoudend sap *Dilution virus containing sap*	Onv.[2]) *Undil.*	Onv. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Onv.[2]) *Undil.*	Onv. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	10
Toetsplant / *test plant*											
Dianthus caryophyllus . 1			80	66	50	–[3])					
Dianthus barbatus . . . 2					66						
Chenopodium quinoa . 3		57,9	43,9	41,0	14,3			100	31,4	24,2	
Spinacea oleracea . . . 4											
Phytolacca esculenta . . 5		100	48,7								
Gomphrena globosa . . 6		54,5	22,6	–	–			100	36,5	36,3	
Amaranthus retroflexus . 7											
Phaseolus vulgaris . . . 8		0,1	0,0	0,0							
Vicia faba 9											
Vigna sinensis 10						0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	
Nicotiana tabacum . . 11	1,6	0,0	0,0	–			1,7	0,1	0,0	0,0	
Nicotiana glutinosa . . 12							26,5	2,2	0,4	0,0	
Solanum lycopersicum . 13							66,7	50,0′)	0,0′)	0,0	0
Antirrhinum majus . . 14											
Cucumis sativus 15	8,1x	1,1x	0,4x	0,0x			10,8	1,8	0,0	0,0	
Brassica oleracea var. botrytis 16											
Sinapis alba 17											
Matthiola incana . . . 18											
Callistephus chinensis . 19	32,6x	3,1x	0,0x								
Helianthus annuus . . . 20											

[1]) Afgekorte naam van het virus.
[2]) Mengsels samengesteld uit gelijke volumedelen onverdund virushoudend sap en 10^{-1} verdund sap van gezonde anjerplanten.
[3]) Geeft aan dat bij deze verdunning op de betreffende toetsplant de verdunningsgrens werd bereikt.
[4]) Deze bepaling werd uitgevoerd aan afgesneden bladeren.
* De virushoudende oplossingen werden met sap afkomstig van dezelfde partij gezonde anjerplanten gemengd (ook gelijk aan die in tabel 5 gemerkt *).
x Deze waarden werden niet gelijktijdig met de overige bepaald, terwijl gebruik werd gemaakt van een andere virusoplossing.
′) Zie ook foto no. 1 en 2.
**) Zie voor de gemiddelde aantallen lokale vlekken per proefserie Addendum II.1.

*6. Activity percentages from mixtures of equal volumes of undiluted or diluted virus-containing plant juices and undiluted or diluted (columns 1) sap from healthy carnation plants, determined simultaneously on different species for each of the viruses indicated.**)*

ingspotvirus* R.S.V.[1])*				Ratelvirus* R.V.[1])*					Stoppelknolvirus S.K.V.[1])				
2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	
Onv. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	Onv.[2]) *Undil.*	Onv. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	Onv.[2]) *Undil.*	Onv. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	
													1
													2
50,4	47,8	7,1	7,4		33,8	29,8	7,8	–	100	50,6	100	0,0	3
					100	100	100						4
100					63,9	79,7	22,0						5
46,4	30,8	33,6			51,0				100	18,4	0,0	–	6
									100×	14,6×	0,0×		7
3,2	0,6	0,1											8
2,8	0,0	–											9
16,6×	0,7×												10
0,9	0,2	0,2		10,7	0,2	0,0	0,0		1,0′)	0,0	0,0	0,0	11
				2,4[4])	0,3[4])				66,6	16,6	0,0	0,0	12
													13
0,2×	0,0×	0,0×	0,0										14
8,6	1,9	0,4		22,8	4,0	0,0	0,0						15
									25,0	0,0	0,0		16
									0,0	0,0	0,0	0,0	17
									20,0×	0,0×	0,0×		18
													19
									0,0	0,0	0,0	0,0	20

[1]) *Names of viruses abbreviated according to table p. 252 and 253.*

[2]) *Mixtures of equal volumes of undiluted virus-containing plant juices and sap of healthy carnation plants, diluted 10^{-1}.*

[3]) *Indicates that the above mentioned virus dilution is identical with the dilution endpoint on the test plant involved.*

[4]) *This assay has been carried out on detached leaves.*

* *The virus solutions were mixed with sap from healthy carnation plants from one stock (the same as marked * in table 5).*

x *These data have not been determined simultaneously with the rest and another virus solution also was used.*

′) *See also photograph nos. 1 and 2.*

**) *The mean numbers of local lesions of each series are listed in Addendum II.1.*

TABEL 7. Effect van de verlaging der inhibitor-concentratie op het activiteitspercentage bij verschillende virusconcentraties.
Gemengd werden gelijke volumedelen van onverdund virushoudend sap, of verdunningen hiervan, en onverdund of verdund sap van gezonde anjerplanten. Alle mengsels die eenzelfde virus bevatten werden gelijktijdig getoetst.

Table 7. Effect of decreasing inhibitor concentrations on the activity percentages of virus solutions of various strengths.
Equal volumes of undiluted or diluted virus-containing juices and undiluted sap from healthy carnation plants were mixed. The different mixtures of each virus were inoculated simultaneously.

Sap van anjerplanten[1]) *Sap from carnation plants[1])*		Onverdund *Undiluted*	Verdund 10^{-1} *Diluted*	Verdund 10^{-2} *Diluted*	Virus[2])	Toetsplant *Test plant*
Kolom nummer *Column No.*		1	2	3		
Virushoudend plantesap *Virus-containing plant juice*	Onverdund *Undiluted*	0,0	7,6	59,8	T.M.V.[3]) [4]) [5])	Nicotiana glutinosa
		0,2′)	10,7′)	100	R.V.	Nicotiana tabacum
		0,3′)	2,4′)	44,7	R.V.[4])	Nicotiana glutinosa
		0,0	0,4	25,6	S.K.V.[5])	Nicotiana tabacum
		0,0	37,5	–	P.V.l.	Phaseolus vulgaris
		1,2	15,4	–	T.N.V.[5])	Nicotiana tabacum
		0,2′)	6,2′)	–	R.S.V.	Antirrhinum majus
		1,8′)	10,8′)	–	B.S.V.	Cucumis sativus
		1,7	18,8	–	A.M.V.[5])	Cucumis sativus
	Verdund 10^{-1} *Diluted*	0,0	2,0	24,8	T.M.V.[4]) [5])	Nicotiana glutinosa
		0,0′)	–	–	R.V.	Nicotiana tabacum
		–	–	–	R.V.[4])	Nicotiana glutinosa
		0,0	0,4	100	S.K.V.[5])	Nicotiana tabacum
		0,0	50,0	–	P.V.l.	Phaseolus vulgaris
		0,0	17,0	–	T.N.V.[5])	Nicotiana tabacum
		0,0′)	5,0[5])	–	R.S.V.	Antirrhinum majus
		0,0′)	1,2[5])	–	B.S.V.	Cucumis sativus
		0,1	16,4	–	A.M.V.[5])	Cucumis sativus
	Verdund 10^{-2} *Diluted*	0,0	1,3	8,3	T.M.V.[4]) [5])	Nicotiana glutinosa
		0,0′)	–	–	R.V.	Nicotiana tabacum
		–	–	–	R.V.[4])	Nicotiana glutinosa
		0,0	0,0	100	S.K.V.[5])	Nicotiana tabacum
		0,0	0,0	–	P.V.l.	Phaseolus vulgaris
		–	9,2	49,0	T.N.V.[5])	Nicotiana tabacum
		0,0′)	–	–	R.S.V.	Antirrhinum majus
		0,0′)	–	–	B.S.V.	Cucumis sativus
		0,0′)	–	–	A.M.V.[5])	Cucumis sativus

[1]) Behalve bij T.N.V. en S.K.V. werd steeds sap gebruikt van gezonde anjerplanten van eenzelfde voorraad (dezelfde als die gemerkt * in de tabellen 5 en 6).
*With the exception of the experiments with T.N.V. and S.K.V., sap from healthy carnation plants of one stock has been used (the same as marked * in table 5 and 6).*

[2]) Voor de betekenis der gebruikte afkortingen, zie tabel 1 p. 252 en 253.
Names of viruses abbreviated according to table 1 p. 252 and 253.

[3]) Dit T.M.V. was een gezuiverd preparaat, dat onverdund 330 γ virus/ml bevatte.
This undiluted purified T.M.V. preparation contained 330 γ virus/ml.

[4]) De bepalingen werden uitgevoerd aan afgesneden bladeren.
Assays have been carried out on detached leaves.

[5]) Zie voor de gemiddelde aantallen lokale vlekken per proefserie Addendum II.2.
For the average numbers of local lesions of each series see Addendum II.2.

′) De met dit teken gemerkte activiteitspercentages werden reeds in tabel 6 vermeld; zie voor gemiddeld aantal vlekken per proefserie Addendum II.1.
Activity percentages marked ′ have already been listed in table 6; for average numbers of local lesions see Addendum II.1.

TABEL 8. Effect van de verhoging der inhibitor–concentratie (boven het niveau in onbehandeld sap van gezonde anjers) op de activiteitspercentages[x]), bepaald op enkele voor de inhibitor minder gevoelige plantesoorten.
De activiteitspercentages, weergegeven in één quotient[3]), werden op dezelfde planten bepaald, uitgezonderd bij anjer, die met spreidsymptomen reageerde en bij Phytolacca gemerkt met ′.

Table 8. Effect of increasing the inhibitor concentration above the level normally found in sap of healthy carnation plants as determined by activity percentages on some test plants less sensitive to the inhibitor.
Activity percentages[x]) of a given ratio[3]) were determined on the same plants, except carnation, which reacted with systemic symptoms and Phytolacca marked ′.

Naam virus[1]) *Name of virus[1])*	A.M.V.				R.V.				R.S.V.				
Verdunning virushoudend sap *Dilution virus containing sap*	Onverd. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	$\frac{cg}{co}$[2])	Onverd. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	$\frac{cg}{co}$[2])	Onverd. *Undil.*	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	$\frac{cg}{co}$[2])
Toetsplant *Testplant*													
Dianthus caryophyllus	100/100	50,0/62,5	12,5/37,5	8									
Chenopodium quinoa	22,3/100			4,4*	4,6/40,9	0,0/23,9	0,0/7,3	4,4*	3,0/61,1	0,7/69,9	0,7/32,8	0,0/2,6	7,5*
Phytolacca esculenta	2,4/30,0	2,7/16,8		8	11,3′/100	22,0′/100	0,6′/100	4,4*	15,4′/100	?′/100	–′[4])		7,5*
Gomphrena globosa										17,8/100	0,4/100	2,5/19,7	7,5*

[1]) Voor de betekenis der afkortingen zie tabel 1 p. 252 en 253.
[2]) $\frac{cg}{co}$ geeft de verhouding van de inhibitorconcentratie in geconcentreerd en onbehandeld anjersap aan.
[3]) In de teller: het activiteitspercentage van de mengsels virushoudend sap (of verdunning hiervan) + anjersap cg. In de noemer: idem + anjersap co.
[4]) Geeft aan dat bij deze virusverdunning op de betreffende toetsplant de verdunningsgrens bereikt werd.
*) Voor deze proeven werd sap van eenzelfde partij gezonde anjerplanten gebruikt.
[x]) Zie voor het gemiddelde aantal lokale vlekken per proefserie Addendum II.3 (bij anjer zijn de aantallen zieke planten vermeld).

[1]) *Names of viruses abbreviated according to table 1 p. 252 and 253.*
[2]) $\frac{cg}{co}$ *indicates the ratio of the inhibitor concentration in concentrated and untreated carnation sap.*
[3]) *Denominator: activity percentage from the mixtures virus-containing sap (or dilutions thereof) + carnation sap cg. Numerator do + carnation sap co.*
[4]) *Indicates that the above mentioned virus dilution is identical with the dilution endpoint for the test plant involved.*
*) *Experiments carried out with sap from one stock of healthy carnation plants.*
[x]) *For the average number of local lesions in each series see Addendum II.3 (with carnation the number of diseased plants are given).*

TABEL 9. Activiteitspercentages van de mengsels onverdund virus-onverdund anjersap, ontleend aan tabel 6.
Activity percentages of mixtures undiluted virus-undiluted carnation sap, taken from table 6.

Virus / *Virus* / Waardplant / *Host*	A.M.V.	R.V.	R.S.V.	B.S.V.	S.K.V.
Nicotiana glutinosa	–	0,3	–	2,2	
Nicotiana tabacum	0,0	0,2	0,9	0,1	0,0
Phaseolus vulgaris	0,1	–	3,2	–	–
Vigna sinensis	–	–	–	0,0	–
Cucumis sativus	1,7	4,0	8,6	1,8	–
Chenopodium quinoa	57,9	33,8	50,4	100	50,6
Gomphrena globosa	54,5	51,1	46,4	100	18,4
Phytolacca esculenta	100	63,9	100	–	–

e. Er blijkt een systematische verwantschap te bestaan tussen de voor de anjerinhibitor weinig tot matig gevoelige waardplanten (vergelijk de tabellen 6 en 9 met tabel 2). Hieruit blijkt namelijk, dat bedoelde planten alle tot eenzelfde orde behoren, die der Centrospermae.

f. Verlaging van de virusconcentratie in de virus-anjersap-mengsels bij gelijk blijvende inhibitorconcentratie leidt tot een verlaging van de activiteitspercentages (zie tabel 6, de kolommen 2, 3 enz. en tabel 7). Bij de matig tot weinig gevoelige planten is deze verlaging soms zeer gering en resulteert, met uitzondering van S.K.V., nooit in een activiteitspercentage 0. Met de verdunningen van S.K.V., die op de matig tot weinig gevoelige waardplanten een activiteitspercentage 0 opleverden, werd voor twee soorten tevens nagenoeg de verdunningsgrens bereikt (zie Addendum II).

g. Verlaging van de inhibitorconcentratie in de virus-anjersapmengsels leidt bij gelijk blijvende virusconcentratie tot een verhoging van de activiteitspercentages (zie tabel 6, de kolommen 1 en 2 en tabel 7).

h. Verhoging van de inhibitorconcentratie in de toetsmengsels door concentratie van het oorspronkelijke sap door middel van het vries-droogproces, leidt bij de matig tot weinig gevoelige waardplanten tot zeer lage activiteitspercentages (zie tabel 8).

i. Verandering van de inhibitorconcentratie heeft een groter effect op de activiteitspercentages dan een evenredige verandering van de virusconcentratie (zie tabel 7 en 8). Zo is in tabel 7 de toeneming van de activiteitspercentages in eenzelfde kolom van beneden naar boven ten aanzien van eenzelfde virus, zowel absoluut als relatief kleiner dan de toeneming van het activiteitspercentage bij een evenredige verlaging van de inhibitorconcentratie, gaande van links naar rechts.

j. Bij optimale inhibitorconcentraties kunnen zeer hoge virusconcentraties volkomen of nagenoeg volkomen onwerkzaam worden gemaakt, terwijl de hoogte der optimale inhibitorconcentratie een maat is voor de gevoeligheid van de waardplant voor de inhibitor (vergelijk bijvoorbeeld tabel 7 kolom 3 en 2 met 1 en zie tabel 8).

k. Mengsels van virus-anjersap-verdunningen, met eenzelfde concentratieverhouding van virus en inhibitor als in het mengsel van de onverdunde oplossingen, vertonen een hoger activiteitspercentage, naarmate de concentratie der actieve bestanddelen lager ligt (zie: tabel 7 en onder h). De mengsels virus

10^{1} verdund-anjersap 10^{-1} verdund van de virussen A.M.V., P.V.1, R.S.V. en T.M.V. bezitten namelijk alle een hoger activiteitspercentage dan de corresponderende mengsels van de onverdunde oplossingen. Bij T.M.V. is het activiteitspercentage van de combinatie 10^{-2} verdund virus-10^{-2} verdund anjersap niet alleen hoger dan de combinatie 10^{-1}-10^{-1} verdund, maar ook dan de combinatie onverd.-onverd. Dit fenomeen is niet het gevolg van een nivellering van de verschillen tussen toets en controle bij de lagere virusconcentraties, maar wordt vooral veroorzaakt door een absolute toeneming van het aantal infecties onder invloed van de lagere inhibitorconcentraties.

l. Volstrekt ongevoelige waardplanten zijn in het kader van dit onderzoek niet gevonden. Zelfs bij anjer werd een duidelijke vermindering van de activiteitspercentages bij een geschikte concentratieverhouding van inhibitor en virus gevonden. De hiervan in tabel 8 gegeven cijfers, geven een minder geprononceerd beeld dan in werkelijkheid kon worden waargenomen. De sterke vertraging in de opkomst van het ziektebeeld in de series met geconcentreerd anjersap komt namelijk niet tot uiting (zie hiervoor Addendum II.3).

m. Het onder j. geformuleerde, dat onder andere is gebaseerd op het volledig achterwege blijven van symptomen bij toetsing op *Nicotiana glutinosa* van het mengsel onverdund anjersap –T.M.V.-oplossing met 330 γ virus/ml suggereert, dat de werking van de inhibitor bestaat in het bezetten, respectievelijk blokkeren van normaal door het virus in te nemen posities in de nabijheid van het bladoppervlak. Over de aard van deze posities kan niets met zekerheid worden gezegd. Men zou ze kunnen opvatten als werkzame groepen van bepaalde enzymsystemen.

n. De verschillen in gevoeligheid voor de remstof tussen de onderscheiden plantesoorten, zou een gevolg kunnen zijn van verschillen in aantal van de onder m. bedoelde aangrijpingspunten, of van een andere rangschikking hiervan.

5. SAMENVATTING

Van een belangrijke specifieke invloed van het virus op het al of niet tot stand komen van het effect van de verminderde infectieuziteit van een virushoudende oplossing bij aanwezigheid van anjerinhibitor is niets gebleken.

De grote verschillen in reactie van uiteenlopende plantesoorten op de aanwezigheid van de anjerinhibitor in de mengsels (uitgedrukt in activiteitspercentages) maken het daarentegen zeer waarschijnlijk, dat de voornaamste aangrijpingspunten van de inhibitor in de toetsplanten zijn gelegen.

Hoewel er zeer grote verschillen in gevoeligheid zijn aan te wijzen, blijkt geen enkele van de onderzochte plantesoorten uiteindelijk geheel ongevoelig voor de inhibitor te zijn, zelfs anjer niet. Bij optimale inhibitorconcentraties kunnen namelijk ook op voor de inhibitor weinig gevoelige plantesoorten aanzienlijke virusconcentraties grotendeels onwerkzaam worden gemaakt.

Daar bij plantesoorten die voor de inhibitor gevoelig zijn reeds met onbehandeld anjersap zeer hoge virusconcentraties volledig onwerkzaam gemaakt worden (330 γ T.M.V./ml), zou de werking van de inhibitor kunnen bestaan in het bezetten of blokkeren van normaal door het virus in te nemen posities in de nabijheid van het bladoppervlak. De verschillen in gevoeligheid tussen de onderscheiden plantesoorten zou dan een gevolg kunnen zijn van verschillen in aantallen van dergelijke aangrijpingspunten op bladeren van uiteenlopende plantesoorten, of van een andere rangschikking.

HOOFDSTUK III

NADER ONDERZOEK NAAR HET AANGRIJPINGSPUNT VAN DE INHIBITOR UIT ANJER

1. INLEIDING

De in het vorige hoofdstuk besproken proeven ter bepaling van het werkingsspectrum van de anjerinhibitor, hebben tevens geleid tot een voorlopige uitspraak aangaande het mechanisme der door deze inhibitor veroorzaakte virusremming. Immers, daar de grootte van het effect der virusremming in sterke mate bleek af te hangen van de getoetste plantesoort, werd gesuggereerd, dat het aangrijpingspunt van de anjerinhibitor vermoedelijk in de planten was gelegen. Hierbij werd bovendien minder gedacht aan een specifieke invloed van de toetsplant op een mogelijk inhibitor-viruscomplex, dan aan een bezetting door de inhibitor als zodanig van nabij het bladoppervlak gelegen aangrijpingspunten, die door het virus dienen te worden bezet. Om de geldigheid van deze voorlopige conclusie nader te onderzoeken en zo mogelijk het inzicht in het reactiemechanisme te verdiepen, werden een aantal uiteenlopende proeven uitgevoerd, die in dit hoofdstuk zullen worden besproken.

De variatie in de proefopzetten lag niet alleen voor de hand vanwege het feit, dat bij het zich manifesteren der virusremming drie onderscheiden grootheden betrokken zijn, maar bleek ook noodzaak, daar ieder proeftype afzonderlijk geen volledige opheldering van het ter discussie gestelde fenomeen vermocht op te leveren.

In een eerste experiment werd onderzocht of de tijd, gedurende welke het virus en de inhibitor in vloeistofmilieu naast elkaar voorkomen, van invloed was op de mate van de remming. Met andere woorden, er werd onderzocht of er sprake was van een reactie tussen beide componenten, hetzij van aflopende aard, hetzij leidend tot de instelling van een evenwicht.

Hierop volgend werden proeven uitgevoerd, waarin onderzocht werd of het mogelijk was in vitro een scheiding tussen virussen en remstof te bewerken. Als bijkomend resultaat leverden deze experimenten een benadering voor de molecuulgrootte van de anjerinhibitor op.

Hierna werd ook de plant weer in het onderzoek betrokken in een proefserie, waarbij remstof en virus afzonderlijk aan het toetsobject werden toegevoegd.

Tenslotte werd een poging gedaan om, gebruik makend van de nieuwste inzichten omtrent het infectieuze principe van het virus, de aard van een mogelijke blokkering door de remstof van de essentiële posities voor de virusinfectie nabij het bladoppervlak op te helderen.

2. IS DE MATE VAN DE REMMING AFHANKELIJK VAN DE TIJD, GEDURENDE WELKE INHIBITOR- EN VIRUSOPLOSSING GEMENGD VOORKWAMEN?

2.1. Proeven

Indien de remming der virusactiviteit een gevolg zou zijn van een wisselwerking in vloeistofmilieu tussen virus en remstof, dan zou de mate van de remming op enigerlei wijze afhankelijk zijn van de tijdsduur der onderlinge beinvloeding. Dit zou zowel gelden, als beide betrokken zouden zijn in een chemische reactie dan wel in een fysisch-chemisch proces en ook, indien de remstof het karakter van een enzym zou hebben, onder invloed waarvan het virus zou worden afgebroken. Om dit fenomeen te kunnen bestuderen diende – zoals in het vorige hoofdstuk is gebleken – de concentratie van de remstof in het mengsel aangepast te worden aan de „gevoeligheid" van het gekozen plantaardige toetsobject. Immers, bij gevoelige planten, als onder andere tabak en *Nicotiana glutinosa*, werden hoge virusconcentraties door een remstofconcentratie als in onverdund anjersap reeds dan volledig onwerkzaam gemaakt, wanneer de inoculatie plaats had onmiddellijk nadat beide componenten waren gemengd.

Bij het hier te bespreken experiment werd gebruik gemaakt van afgesneden bladeren van *Nicotiana glutinosa*, van een gezuiverd T.M.V.-preparaat en van een tweetal verdunningen van heldergecentrifugeerd anjersap. De blaadjes werden gebruikt in de bladhelften-toets, waarbij op de ene helft een mengsel van virus- en inhibitor-oplossing werd geïnoculeerd, dat gedurende kortere of langere tijd bij kamertemperatuur had gestaan; op de controle-helft hetzelfde mengsel onmiddellijk, nadat het was samengesteld. Indien hier inderdaad de factor tijd een rol zou spelen bij het proces der virusremming, zou dat moeten blijken uit een verschil in aantallen lokale vlekken bij de toets- en controlehelften der verschillende proefseries.

2.1.1. Uitvoering der proeven

Het gebruikte, gezuiverde T.M.V.-preparaat bevatte 33 γ virus/ml. De inhibitorhoudende oplossingen waren verdunningen 10^{-1} en 10^{-2} met H_2O van sap, afkomstig van in diepvries bewaarde, verhoute anjerspruiten, dat gedurende 45 minuten bij 10.000 t./min. (= max. 11.250 *g*) was gecentrifugeerd. Van de virus- en inhibitoroplossingen werden gelijke volumina gemengd. De toetsmengsels werden respectievelijk 15, 30, 60, 120 en 180 minuten bij kamertemperatuur bewaard, alvorens zij op de helften der afgesneden *Nicotiana glutinosa* bladeren werden uitgestreken. De controle-mengsels werden onmiddellijk voor gebruik samengesteld uit de afzonderlijke oplossingen, die een overeenkomstige tijd bij kamertemperatuur waren bewaard. Het tijdsverloop tussen het mengen van een controle-oplossing en het inoculeren van alle controlehelften van een serie, bedroeg minder dan één minuut. Iedere proefserie bestond uit zes bladeren. Voor bijzonderheden aangaande de wijze van inoculeren zie II.3. De blaadjes werden in petrischalen op vochtig filtreerpapier gelegd en in het licht van T.L.-buizen gezet.

2.1.2. Resultaten der proeven

De tellingen der vlekken leverden voor de mengsels, die de anjersapverdunning 10^{-1} bevatten, zowel voor toets- als controle-helften, zeer geringe aantallen

op. Het maximum der gemiddelde aantallen lag bij 9. Bij de mengsels, waarbij de verdunning 10^{-2} van het anjersap gebruikt was, waren die aantallen hoger, namelijk maximaal 49. Het gemiddelde aantal vlekken per bladhelft bij gebruik van genoemde virusoplossing gemengd met een gelijk volume H_2O bedroeg voor 18 bladeren 175.

Zoals uit gegevens van tabel 10 blijkt, waar van elke serie de gemiddelde aantallen vlekken per bladhelft in de vorm van een quotiënt zijn weergegeven (teller heeft betrekking op toetshelft, noemer op controle-helft), zijn de verschillen tussen toets en controle binnen de diverse series, bij gebruik van 10^{-1} verdund anjersap, uiteraard bijzonder klein. Bovendien is er van een regelmatige toeneming van de remming met toenemende tijdsduur tussen het samenstellen van de toetsvloeistof en het inoculeren geen sprake.

Bij gebruik van de anjersapverdunning 10^{-2} zijn de verschillen binnen de series duidelijker, althans indien men de resultaten uitdrukt op de wijze als in tabel 10. Ook hier is echter van een regelmatige vergroting van de remming met toenemende tijd van wederzijds contact tussen virus en remstof geen sprake.

TABEL 10. Invloed van toenemende tijdsduur tussen mengen van virus en anjerinhibitor en inoculeren van het mengsel op de activiteit van het virus.
De bepalingen werden uitgevoerd op afgesneden bladeren van *Nicotiana glutinosa* volgens de bladhelften-methode. De getoetste mengsels bevatten gelijke volumedelen van een T.M.V.-oplossing met 33 γ T.M.V./ml en van één van beide anjersapverdunningen. Alle bepalingen in zesvoud.

Table 10. Effect of increasing time intervals between mixing virus and inhibitor from carnation and inoculating the mixture on the inhibitation of virus activity.
Detached leaves of Nicotiana glutinosa were used in the half-leaf test (six leaves in each series). The mixtures inoculated contained equal volumes of a T.M.V.-solution with 33 γ T.M.V./ml and one of both carnation sap dilutions.

Tijd tussen samenstellen van mengsel en inoculeren, in min. *Time in minutes between mixing virus and inhibitor, and inoculation*	Gemiddeld aantal vlekken per bladhelft van toets (teller) en controle (noemer) voor de anjersapverdunning: *Average number of local lesions per half leaf of test (numerator) and control (denominator), using carnation sap diluted to:*			
	10^{-1}		10^{-2}	
	1	2	1	2
15	0,1/2,5	0,4/10	6/19	3/10
30	0,1*/1,0	1/10	9*/21	4/10
60	0,3/9	0,3/10	14/49	3/10
120	0,5*/1,0	5/10	11*/21	5/10
180	0,5/2,3	2/10	7,5/34	2/10

Kolommen 1: Verhoudingsgetallen der gevonden gemiddelden. Controle-vloeistoffen onmiddellijk voor het inoculeren bereid.
Columns 1: Observed ratios. Control solutions composed immediately before inoculation.
Kolommen 2: Omgerekende verhoudingsgetallen.
Columns 2: Ratios transformed to base 10.

* Verschil tussen toets en controle niet betrouwbaar volgens symmetrietoets van Wilcoxon (zie II.4.2).
Difference between test and control, not statistical significant according to Wilcoxon's test for symmetry.

Indien men volgens de toetsmethode van WILCOXON (zie II.4.2.) voor iedere proefserie nog nagaat of er inderdaad sprake is van een systematisch verschil tussen toets- en controle, dan blijkt dit voor de series in tabel 10 gemerkt met* niet het geval te zijn. Zoals uit zeer talrijke bepalingen is gebleken, was bij gebruik van onverdund anjersap en de virusoplossing, die 33 γ T.M.V./ml. bevat, de remming steeds volkomen, als de menging der componenten onmiddellijk vóór de inoculatie plaats had.

Bij gebruik van de verdunningen 10^{-1} en 10^{-2} van het anjersap, kan derhalve niet worden gesproken van een duidelijke invloed van de factor tijd op de omvang van de remming. Indien de virusremming tòch het gevolg zou zijn van een reactie tussen remstof en virus in vloeistofmilieu, moet het effect ook bij lage concentraties momentaan tot stand komen. In elk geval kan de wisselwerking tussen beide niet van het type enzym-substraat zijn.

3. SCHEIDING VAN VIRUS EN ANJERINHIBITOR IN VITRO

3.1. Proeven met toepassing van ultracentrifugering

Het onderzoek naar de mogelijkheid van een scheiding van virus en anjerinhibitor, door aanwending van grote centrifugaalkrachten, opgewekt in een ultracentrifuge, werd uitgevoerd met sap van mozaiekzieke anjers. Dit uitgangsmateriaal was niet alleen aantrekkelijk, omdat hierin inhibitor en virus onder min of meer natuurlijke omstandigheden naast elkaar voorkomen, maar ook omdat door het onderzoek ervan nieuwe gegevens over de zuivering van virussen uit anjers konden worden verkregen.

Nadat was gebleken, dat bij vrij kortstondig centrifugeren (2 h) met gemiddeld 113.000 *g*, inderdaad actief virus in het sediment voorkwam, lag het voor de hand, de onderzoekingen voort te zetten, met langere centrifugeringstijden en/of grotere centrifugaalkrachten, ten einde enig inzicht te krijgen in de sedimentatie-eigenschappen van de inhibitor. Hierdoor zou immers niet alleen duidelijk worden, hoe groot de speelruimte was tussen volledig neerslaan van het virus en het begin van een merkbare sedimentatie van de inhibitor, maar tevens zou blijken of deze mogelijkerwijze nog samengesteld van aard was en zou de orde van grootte van het (de) moleculairgewicht(en) (M.G.) in beschouwing kunnen worden genomen.

Voor deze onderzoekingen werd zowel sap van zieke als van gezonde anjers gebruikt. Naast een preparatieve rotor werd ook van een analytische rotor gebruik gemaakt. Met behulp van deze laatste kan via een optisch systeem de sedimentatie der deeltjes, mits deze in voldoende concentratie aanwezig zijn, visueel worden vervolgd en desgewenst fotografisch worden vastgelegd.

Als controle op de verplaatsing van de inhibitor onder invloed van het centrifugale veld, werd steeds de biologische activiteit van de bovenstaande vloeistoffen en van het sediment bepaald, ten aanzien van T.M.V. op *Nicotiana glutinosa*.

Deze onderzoekingen vormden tevens de basis voor soortgelijke experimenten, die in het kader van Hoofdstuk IV werden verricht ter isolering, zuivering en identificatie van de anjerinhibitor. Daarom zullen er in deze paragraaf van de proeven ter bepaling van de sedimentatie-eigenschappen van de inhibitor niet meer worden besproken, dan nodig is om tot een eerste benadering van het M.G. te komen.

3.1.1. Uitvoering der proeven

Gewerkt werd met een ultracentrifuge van het type Spinco E (Beckman Instruments Inc., Belmont, Californië, U.S.A.). De ter beschikking staande preparatieve rotor (type K) kan 12 buizen van elk 38,5 ml bevatten, die onder een hoek van 16° in de rotor zijn geplaatst. Er werd gecentrifugeerd met de maximaal voor deze rotor toegestane omwentelingssnelheid van 37.020 t./min. (gemiddelde centrifugaalkracht 113.380 *g*). Met de analytische rotor (type A) werd gewerkt bij de maximaal hiervoor toegestane snelheid van 59.780 t./min. (gemiddelde centrifugaalkracht 254.500 *g*).

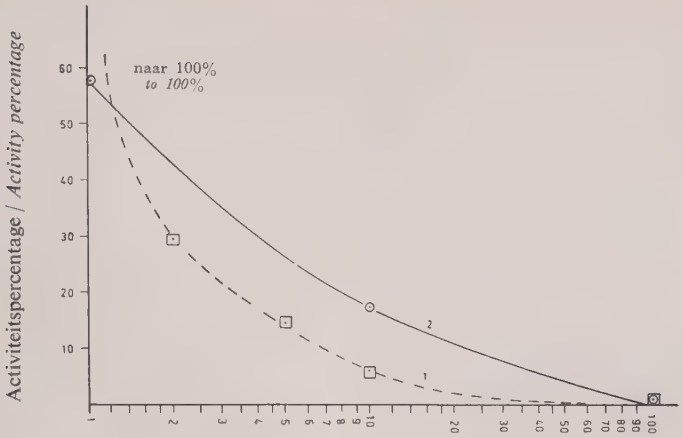
De analytische cel van deze rotor heeft een inhoud van 0,83 ml. Het optisch systeem, gebaseerd op het Schlieren-principe, maakt het mogelijk de verplaatsing van deeltjes, die in een concentratie van minimaal 0,05 % in de vloeistof voorkomen, als een donkere curve op een licht scherm visueel en fotografisch te vervolgen.

Ultracentrifugering werd toegepast op sap van zieke en gezonde anjerplanten. De zieke anjers waren planten uit de volle grond, die op natuurlijke wijze met virussen waren besmet. Zij hadden enkele bloemen. Behalve het (bolvormige) anjermozaiekvirus (A.M.V.), zie foto 3, dat niet door luizen kan worden overgebracht en dat op boon lokale vlekken geeft, kon in deze anjers een zowel door luizen als met sap op anjers en duizendschoon over te brengen virus worden aangetoond. Dit virus is vermoedelijk draadvormig.

Het gezonde materiaal bestond uit gekweekte planten van een tweetal herkomsten. Van een partij waren de stengels verhout. Dit laatste materiaal leverde zeer donkerbruin sap op. De andere partij bestond uit nog niet verhoute planten. Het hieruit gewonnen sap was geel-groen gekleurd. Al het plantemateriaal was vóór gebruik, gedurende kortere of langere tijd, in diepvries bewaard. Het, na fijnmaken der plantedelen en uitpersen door kaasdoek, verkregen sap werd steeds 45 min. gecentrifugeerd bij maximaal 11.250 *g*, alvorens het in de U.C. werd onderzocht.

De activiteit van A.M.V. in de uitgangsvloeistof, in de bovenstaande vloeistof na ultracentrifugering en in de oplossing, die het sediment bevatte, werd bepaald op de enkelvoudige bladeren van boon (*Phaseolus vulgaris* var. Beka).

De activiteit van de inhibitor in de verschillende oplossingen van zowel ziek als gezond uitgangsmateriaal werd gecontroleerd ten aanzien van T.M.V. op *Nicotiana glutinosa*. Gelijke volumina van de virushoudende oplossing (33 γ T.M.V./ml) en van de oplossing, die op inhibitoractiviteit diende te worden onderzocht, werden gemengd en de activiteit van deze mengsels vergeleken met die van een mengsel van gelijke volumina virushoudende oplossing in water, of indien nodig een 1 of 0,1 %-ige waterige NaCl-oplossing (proef 3). Het kwantitatieve resultaat van deze vergelijking werd weer uitgedrukt in een activiteitspercentage. Door grafische weergave van het verband tussen activiteitspercentage en inhibitorconcentratie bij het uitgangsmateriaal, kon na bepaling van de activiteitspercentages de inhibitorconcentratie der verschillende oplossingen bij benadering door interpolatie worden gevonden. Hiertoe werden de activiteitspercentages op gewone schaal en de verdunningen, uitgedrukt in volumedelen oorspronkelijke vloeistof per 100 volumedelen van de betreffende verdunning, op logarithmische schaal, respectievelijk op ordinaat en abscis tegen elkaar uitgezet (zie fig. 1).



Inhibitor-concentratie in % van de concentratie in het uitgangsmateriaal.
Inhibitor concentration as % of the concentration in the starting material.

FIG. 1*. curve 1: Activiteitspercentages van mengsels van gelijke volumedelen van een T.M.V.-oplossing (33 γ virus/ml) en onverdund of verdund sap van gezonde, ten dele verhoute anjerspruiten, bepaald op *Nicotiana glutinosa* (bladhelften-toets, zes bladeren per serie).
curve 2: idem, gebruik makend van sap van gezonde niet verhoute planten (zie proef 3a blz. 277).

Fig. 1. Activity percentages from mixtures containing equal volumes of a T.M.V.-preparation (33 γ virus/ml) and undiluted or diluted sap from healthy carnation plants (half leaf-test, six leaves per series). Diagrams 1 ano 2 refer to two different stocks of carnation plants.

3.1.2. Resultaten der proeven

Proef 1: Scheiding door middel van de preparatieve rotor van A.M.V. en inhibitor, voorkomend in anjersap (oplossing I).

Er werd twee uur gecentrifugeerd bij 37.020 t./min. (gem. 113.380 *g*). Hierna werd de bovenstaande vloeistof (oplossing II) voorzichtig afgepipetteerd en het sediment na goed uitdruipen der centrifugebuis, gesuspendeerd in een hoeveelheid 0,02 Mol. fosfaatbuffer pH 5,4 gelijk aan het uitgangsvolume. Deze suspensie werd 20 min. bij 6000 t./min. (gemiddeld 4000 *g*) gecentrifugeerd, waarna de heldere bovenstaande vloeistof (oplossing III), met licht zijdeachtige glans, voorzichtig werd afgegoten.

Bij toetsing van oplossing I tegen respectievelijk oplossing III, onverdund en 10^{-1} verdund (met H_2O), op de enkelvoudige bladeren van telkens 3 boneplanten, werden in totaal aan necrotische vlekken geteld 1 tegen 573 en 0 tegen 308 vlekken.

Het onderzoek naar de activiteit van de inhibitor in de verschillende oplossingen getoetst tegen T.M.V. op bladhelften van *Nicotiana glutinosa* leverde bij gebruik van 3 of 5 blaadjes per serie de volgende activiteitspercentages op:

* Schrijver wil de Heer C. F. Scheffel hartelijk dankzeggen voor het tekenen der figuren.

	Onverdund	10^{-1} verdund	Aantal bladeren per serie:
Oplossing I	4,8[1])	33,0[2])	5
Oplossing II	5,4	18,4	3
Oplossing III	54,3	–	3

[1]) Niet gelijktijdig met de andere waarden bepaald.
[2]) Afzonderlijk bepaald onder gebruikmaking van vloeistof, die 24 h bij 10°C had gestaan, terwijl de overige vloeistoffen in de ijskast waren bewaard.

Uit de resultaten van de inoculaties op boon kan worden geconcludeerd, dat, zo er in vitro al sprake is van een wisselwerking tussen inhibitor en virus, deze toch niet van dien aard is, dat beide zich in een krachtig centrifugaalveld als een eenheid gedragen. Uit de verschillende activiteitspercentages blijkt, dat slechts een zeer geringe hoeveelheid inhibitor met het virus is neergeslagen, namelijk in de orde van 3 % van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid (geïnterpoleerd).

Proef 2: Onderzoek naar de sedimentatie-eigenschappen van de inhibitor met behulp van de analytische rotor.

Uitgegaan werd van hetzelfde anjersap als in de vorige proef, namelijk sap van op natuurlijke wijze met virus besmette anjers. Er werd 5 h en 35 min. bij 59.780 t./min. (gemiddeld 254.000 *g*) gecentrifugeerd, nadat eerst 20 min. bij 42.040 t./min. (gemiddeld 125.700 *g*) was gedraaid. Tijdens de proef was de temperatuur van de rotor gemiddeld 25,6°C.

Het lag in de bedoeling de verplaatsing der deeltjes onder invloed van het centrifugale veld fotografisch vast te leggen en, door toetsing van de bovenstaande vloeistof en het sediment tegen T.M.V. op *Nicotiana glutinosa*, eventueel waargenomen curven te identificeren met de zich verplaatsende inhibitor. In de loop van deze proef werd echter in het geheel geen sedimentatiediagram gevormd. Zelfs de in het sap aanwezige virussen waren blijkbaar in te lage concentratie aanwezig.

Na centrifugering werd de bovenstaande vloeistof met behulp van een injectiespuitje van 0,5 ml inhoud, voorzichtig in vier fracties van gemiddeld 0,2 ml uit de cel opgezogen. Deze fracties, genummerd 1 tot en met 4, vertegenwoordigden even zoveel verticale vloeistoflagen, zoals deze tijdens het centrifugeren, gaande van de rotatie-as naar buiten, gerangschikt waren. De verplaatsing der deeltjes in een analytische cel heeft namelijk uitsluitend in horizontale richting plaats. Het sediment werd in 0,8 ml 0,02 Mol. fosfaatbuffer pH 7 gesuspendeerd.

De activiteitspercentages van de verschillende oplossingen bedroegen voor series van 3 tot 5 *Nicotiana glutinosa*-blaadjes:

	Onverdund	Aantal bladeren per serie
uitgangsvloeistof	4,8[1]) (33,0)	5
fractie 1	77,4	3
fractie 2	65,9	3
fractie 3	11,5	3
fractie 4	8,4	3
opgenomen sediment	49,6	3

[1]) Dit percentage werd bepaald voor vloeistof, die tijdens de proef in de ijskast was bewaard. Het tussen haakjes hierachter geplaatste getal geeft het percentage weer voor de verdunning 10^{-1}.

Uit deze resultaten blijkt, dat er een duidelijke verplaatsing van de inhibitor onder invloed van het centrifugale veld heeft plaats gevonden. Uit de helft van de vloeistof is nagenoeg alle remstof uitgeslingerd. Er heeft zich echter betrekkelijk weinig remstof tegen de buitenwand afgezet.

Op grond van deze beide constateringen kan dan ook voorlopig gezegd worden, dat het onwaarschijnlijk is, dat er in anjersap twee of meer typen van inhibitoren voorkomen met sterk uiteenlopende molecule-grootten.

Proef 3a: Benadering van de sedimentatieconstante van de inhibitor uit de na biologische toetsing gebleken verplaatsing hiervan.

Aan het hier uiteen te zetten experiment was een ander voorafgegaan, waarbij gebruik werd gemaakt van sap van gezonde anjers (niet verhoute planten), dat door middel van het vries-droogproces zesvoudig was geconcentreerd. Wij hoopten de concentratie van de inhibitor zodanig te verhogen, dat tijdens het centrifugeren de verplaatsing ervan door het optische systeem zou kunnen worden geregistreerd.

Toen ook dit concentreren geen succes opleverde werd getracht op indirecte wijze een eerste indruk te krijgen van de grootte van de sedimentatieconstante. Hiertoe werd niet-geconcentreerd sap van dezelfde gezonde anjers gedurende 8 h bij 59.780 t./min. (gemiddeld 254.500 *g*) gecentrifugeerd. De temperatuur van de rotor bedroeg tijdens de centrifugering 20,3°C. Na het tot stilstand komen van de rotor werd de vloeistof uit de cel onmiddellijk en uiterst voorzichtig in een viertal fracties opgezogen. Het volume hiervan werd door weging bepaald en bedroeg, bij een aangenomen s.g. van 1, voor de fracties 1 t/m 4 respectievelijk 0,219; 0,154; 0,192; 0,198 ml. Het sediment werd gesuspendeerd in 0,8 ml 1%-ige NaCl-oplossing. De inhibitor bleek hierin uitstekend op te lossen. De verschillende fracties en de suspensie, die het sediment bevatte, werden alle onverdund, fractie 4 en de suspensie van het sediment tevens in de verdunning 10^{-1}, tegen T.M.V. op telkens zes *Nicotiana glutinosa* bladeren getoetst. Van fractie 4 werd ook nog de verdunning 10^{-2} getoetst. De uitgangsvloeistof, die eveneens zowel onverdund als 10^{-1} en 10^{-2} verdund op telkens zes *Nicotiana glutinosa* bladeren werd getoetst, was – ter compensering van een eventueel effect van de hogere temperatuur tijdens de centrifugering – een overeenkomstige tijd bij een temperatuur van 21°C bewaard. De verschillende activiteitspercentages die, voorzover niet afzonderlijk is aangegeven, gelijktijdig werden bepaald, bedroegen:

	Onverdund	10^{-1} verdund	10^{-2} verdund
oorspronkelijke vloeistof	0,0	17,5	57,7
fractie 1 (0,219 ml)	100	–	–
fractie 2 (0,154 ml)	57,1	–	–
fractie 3 (0,192 ml)	1,0	–	–
fractie 4 (0,198 ml)	0,0	6,2[1])	31,5[1])
gesuspendeerd sediment (0,8 ml)	85,5	100	–

[1]) Deze waarden werden drie dagen later dan de andere, maar wel op blaadjes afkomstig van dezelfde planten, bepaald.

Uit deze waarden volgt duidelijk, dat fractie 1 in het geheel geen aanwijsbare hoeveelheid inhibitor meer bevat, terwijl in fractie 2 nog slechts 1% van de oorspronkelijke hoeveelheid aanwezig blijkt te zijn. In fractie 3 loopt de concentratie snel op. In fractie 4 bereikt zij een waarde van 3,5 tot 4 maal die in het uitgangsmateriaal (geïnterpoleerd, zie hiervoor fig. 1). Het sediment bevat nauwelijks enige inhibitor. Op grond van deze gegevens kan dan ook worden aangenomen, dat de sedimentatiegrens van de inhibitor, dat wil zeggen het vlak, dat de vloeistoflagen met zeer weinig of geen inhibitor van die met veel inhibitor scheidt, na 8 h centrifugeren gelegen is in het midden van fractie 3 (zie fig. 2).

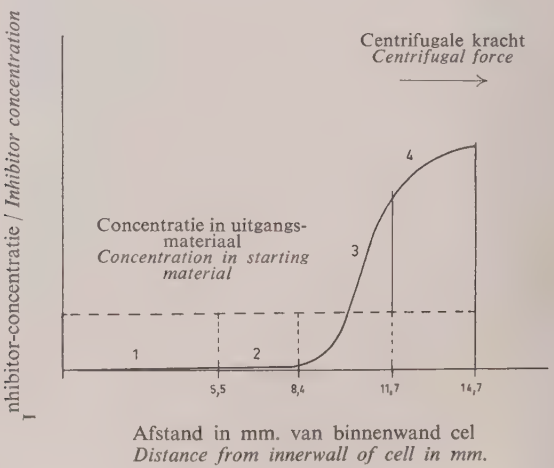


Fig. 2. Schematische voorstelling van de verdeling van de inhibitor in de analytische cel (inhoud 0,83 ml) na 8 h centrifugeren bij 254.000 *g*. Deze verdeling werd afgeleid uit de remmende werking van de vloeistof uit vier opeenvolgende lagen (1 t/m 4), bepaald ten opzichte van T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* (zie proef 3a blz. 277).

Fig. 2. Schematic diagram of inhibitor distribution in the analytical cell (content 0.83 ml) after centrifuging carnation sap during 8 hrs. at 254,000 g. Determined by the inhibiting action on T.M.V. and Nicotiana glutinosa of four successive fractions (six leaves per series).

Hiervan uitgaande, kon nu de sedimentatieconstante[1]) worden berekend, daar de afstand van dit scheidingsvlak tot de binnenzijde van de in horizontale doorsnede sectorvormige cel kon worden bepaald door gebruik te maken van de door weging bepaalde volumina der fracties. Deze afstand bedroeg 10,1 mm. De $s_{20} = 1{,}4$ S. Deze waarde geldt alleen, als er zich onder de omstandigheden van de proef geen sedimentatie-evenwicht heeft ingesteld. Ook moet men bedenken, dat de tegengesteld aan de centrifugaalkracht werkende diffusie, tijdens het uitlopen van de rotor, het eindresultaat zeker nog enigszins heeft beïnvloed. Nemen wij voor het inhibitormolecule de bolvorm aan, dan wijst een waarde van s_{20}, zoals werd berekend, op een moleculair gewicht in de orde van minimaal 10.000.

Proef 3b: Een proef, gelijk aan die hierboven beschreven – echter met een inhibitoroplossing, die 1% NaCl bevatte – leverde een bevestiging van de boven gegeven resultaten op. Deze inhibitor was afkomstig van gezonde anjers van een andere herkomst (anjers met verhoute stengels) dan die in proef 3 gebruikt.

De remstof was door ultracentrifugering gedurende 12 h met behulp van de preparatieve rotor neergeslagen en het neerslag gesuspendeerd in de verdunde zoutoplossing (in 1/10 van het oorspronkelijke volume). Na helder centrifugeren bij 6000 *g* gedurende 45 min., werd de bovenstaande vloeistof in de analytische rotor gecentrifugeerd als in proef 3a. De verdeling van de remstof na afloop van de centrifugering blijkt uit de hieronder gegeven activiteitspercentages, die werden bepaald als in 3a (vijf bladeren per serie).

	Onverdund	10^{-1} verdund	10^{-2} verdund
oorspronkelijke vloeistof	0,6	9,2	100
fractie 1 (0,284 ml)	66,8	–	–
fractie 2 (0,123 ml)	50,2	–	–
fractie 3 (0,218 ml)	24,8	100	–
fractie 4 (0,166 ml)	0,0	6,8	100
sediment (0,8 ml)	12,8	55	–

Indien de inhibitor inderdaad een M.G. bezit van omstreeks 10.000 wordt het niet alleen begrijpelijk, dat VAN DER WANT (1953) bij niet aflopende dialyse van anjersap in de buitenvloeistof virusremmende bestanddelen kon aantonen, maar ook dat bij een betrekkelijk kortstondige dialyse van ca. 40 h een belangrijk deel van de remstof in de dialyseslang achterbleef (zie I.1.). De geconstateerde, zeer traag verlopende diffusie van inhibitor bij dialyse van anjersap, gebruik makend van cellofaanslang met poriën van 25–80 Å, spreekt ook ten gunste van het vermelde M.G. Immers uitgaande van dit M.G., van een soortelijke dichtheid van 1,4 (een gemiddelde waarde voor eiwitachtige stoffen) en de bolvorm veronderstellende, komt men tot een diameter der inhibitordeeltjes van ongeveer 30 Å.

[1]) Onder sedimentatie constante (s) verstaat men de verplaatsing van een deeltje, uitgedrukt in cm per secunde en bij een kracht van 1 dyne. Als eenheid wordt de S (= Svedberg) aangehouden. Deze is 10^{-13} cm/sec. dyne.

Samenvattend kan met betrekking tot de in het voorgaande besproken U.C.-proeven worden geconcludeerd, dat:

a. het virusremmend principe in anjersap enkelvoudig van aard is;
b. van een complex-vorming tussen virus en anjerinhibitor, in een krachtig centrifugaal veld, niets is gebleken;
c. gezien de sedimentatie-eigenschappen van de anjerinhibitor het zeer goed mogelijk is om virus en inhibitor door ultracentrifugering te scheiden;
d. de concentratie van de inhibitor in perssap van anjers vermoedelijk lager is dan 0,05 %;
e. het M.G. vermoedelijk in de orde van grootte van (minimum) 10.000 valt.

3.2. Proeven met uitzouttechnieken

Omtrent de mogelijkheid van een scheiding van virus en inhibitor, die in eenzelfde oplossing voorkomen, stonden interessante literatuurgegevens ter beschikking. Zo hebben NOORDAM et al. (1951), een zuiveringsmethode voor anjermozaiekvirus uit zieke anjers beschreven, waarbij het virus, na toevoeging van 30 ml ethylalcohol (90 %-ig) aan 100 ml virushoudend plantesap en afcentrifugeren van het ontstane neerslag, door toevoeging van 25 g $(NH_4)_2SO_4$ per ml oplossing, in actieve vorm werd geprecipiteerd. Immers na opnemen van dit $(NH_4)_2SO_4$-neerslag in water, gevolgd door enige uren aflopende dialyse en afcentrifugeren van het hierbij ontstane neerslag, kregen genoemde auteurs bij toetsing op onder andere tabak en aster lokale symptomen, overeenkomend met die veroorzaakt door anjermozaiekvirus. Hier blijkt weer, dat het onwerkzaam worden van het virus bij aanwezigheid van de anjerinhibitor niet een gevolg is van een irreversibele complexvorming en dat, zo er in oplossing al van een wisselwerking tussen beide sprake is, deze gemakkelijk kan worden opgeheven. Ook zou men geneigd zijn te concluderen, dat, hoewel er geen kwantitatieve gegevens worden verstrekt, onder de vermelde omstandigheden althans een gedeelte van de inhibitor niet tegelijk met het virus is neergeslagen.

Dat de scheiding hier inderdaad door toevoeging van het $(NH_4)_2SO_4$ is verkregen en niet door de hieraan voorafgaande aanwending van ethylalcohol, is bij latere onderzoekingen van VAN DER WANT (mondelinge mededeling) en bij eigen experimenten gebleken. VAN DER WANT (1953) verkreeg actief virus door de virus- en inhibitorhoudende oplossingen aan een zuilchromatografische scheidingsmethode te onderwerpen, bekend onder de naam *salting out adsorption* (ontwikkeld door TISELIUS, 1948 en SHEPARD & TISELIUS, 1949). Hierbij worden eiwitachtige verbindingen uit hun waterige oplossingen aan bijvoorbeeld cellulose geadsorbeerd, nadat aan die oplossingen een of ander zout is toegevoegd in een concentratie, die beneden de uitzoutconcentratie voor die eiwitverbinding in vloeistofmilieu ligt. VAN DER WANT kon op deze wijze door toevoeging van 25 g $(NH_4)_2SO_4$ aan 100 ml van een mengsel van gelijke volumina virushoudende oplossing en anjersap het virus aan een cellulosekolom binden en met waterige oplossingen van $(NH_4)_2SO_4$ van lagere concentratie of met water alleen weer in actieve vorm eluëren. Ter verwijdering van aanwezig $(NH_4)_2SO_4$ werden alle eluaten gedurende een nacht in stromend water gedialyseerd. Genoemde auteur werkte zowel met tabaksmozaiekvirus als met anjermozaiekvirus en een tabaksnecrosevirus.

In beide publikaties waren de gebezigde methodieken gericht op de afscheiding van het virus. De gedragingen van de inhibitor tijdens de verschillende

bewerkingen werden door genoemde auteurs niet vervolgd. Daar ze achteraf uit de beschikbare gegevens ook moeilijk of in het geheel niet zijn te reconstrueren, werden ter aanvulling experimenten uitgevoerd, om de invloed van opklimmende $(NH_4)_2SO_4$-concentraties op de oplosbaarheid en de activiteit van de inhibitor te bepalen.

3.2.1. Uitvoering der proeven

Uitgegaan werd van vers uitgeperst sap van in diepvries bewaarde gezonde, reeds verhoute anjerspruiten. Dit sap werd gedurende 45 min. bij gemiddeld 11.250 *g* gecentrifugeerd. Aan een drietal porties van de na centrifugering heldere bovenstaande vloeistof werd vast $(NH_4)_2SO_4$ toegevoegd in hoeveelheden van respectievelijk 25,2; 37,7 en 60,4 g per 100 ml vloeistof overeenkomend met respectievelijk 33,3%-ige, 50%-ige en 80%-ige verzadiging bij kamertemperatuur. Nadat al het $(NH_4)_2SO_4$ was opgelost, werden de ontstane neerslagen in 45 min. bij gemiddeld 11.250 *g* afgecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd hierna voorzichtig afgeschonken en de centrifugebuizen enige tijd omgekeerd neergezet, zodat de aan de wand achtergebleven vloeistof goed kon afdruipen. Vervolgens werd aan de neerslagen een volume water toegevoegd, gelijk aan de uitgangsvolumina anjersap. De neerslagen losten hierin geheel op. Omdat het niet mogelijk was nog achtergebleven $(NH_4)_2SO_4$ door dialyse uit de verkregen oplossingen te verwijderen, zonder eventueel ook inhibitor kwijt te raken, werden om het effect van het zout te elimineren, op geheel overeenkomstige wijze controle-vloeistoffen bereid uit sap van in diepvries bewaarde gezonde tabaksbladeren.

De activiteit van het anjersap, waarvan werd uitgegaan en van de oplossingen der $(NH_4)_2SO_4$-neerslagen hiervan, werd na menging met een gelijk volume gezuiverd T.M.V. (33 γ T.M.V./ml) bepaald op helften van afgesneden blaadjes van *Nicotiana glutinosa*. Als controle werden respectievelijk het gecentrifugeerde tabakssap en de overeenkomstige oplossingen van de $(NH_4)_2SO_4$-neerslagen hiervan, na menging met een gelijk volume van hetzelfde gezuiverde T.M.V., uitgestreken. Op gelijke wijze werden de activiteiten van de verdunningen, van zowel anjersap als van de oplossingen der $(NH_4)_2SO_4$-neerslagen hiervan, bepaald. Alle proefseries bevatten zes blaadjes. Het verband tussen de activiteiten van toets en controle werd weer uitgedrukt in activiteitspercentages (zie II.4.2.).

3.2.2. Resultaten der proeven

De resultaten der proeven blijken duidelijk uit de in tabel 11, pagina 282, weergegeven activiteitspercentages.

De oplosbaarheid van de inhibitor neemt bij oplopende verzadiging van het anjersap met $(NH_4)_2SO_4$ tot 50% duidelijk af. Verzadiging tot 80% heeft geen invloed meer.

Indien men – zoals reeds gezegd – bij het onbehandelde anjersap het verband tussen activiteitspercentage en inhibitorconcentratie grafisch weergeeft, kan men door interpolatie van de activiteitspercentages van de afgeleide oplossingen de inhibitor-concentraties hiervan bij benadering eveneens in procenten van de uitgangsconcentratie opgeven (zie ook fig. 1). De inhibitorconcentratie, uitgedrukt in procenten van de concentratie in het uitgangsmateriaal is op logarithmische schaal uitgezet. Op deze wijze blijkt, dat bij 33,3%-ige verzadiging met

TABEL 11. Effect van toenemende $(NH_4)_2SO_4$-concentraties op de oplosbaarheid van de inhibitor uit anjer.
Weergegeven zijn activiteitspercentages van de mengsels van gelijke volumina der opgeloste neerslagen of verdunningen hiervan en gezuiverd T.M.V. (33 γ T.M.V. per ml), bepaald op helften van afgesneden bladeren van *Nicotiana glutinosa*. De controle-helften werden geïnoculeerd met mengsels van gelijke volumina van het gezuiverde T.M.V. en van de onverdunde of verdunde oplossingen der $(NH_4)_2SO_4$-neerslagen uit sap van gezonde White Burley-tabak. Alle bepalingen in zesvoud.

Table 11. Effect of increasing $(NH_4)_2SO_4$-concentrations on the solubility of the inhibitor from carnation.
Listed are activity percentages of mixtures containing equal volumes of any of the solutions, prepared by dissolving the different precipitates and a purified preparation containing 33 γ T.M.V. per ml. The activity percentages have been determined on detached Nicotiana glutinosa leaves by the half-leaf method (six leaves in each series). Control-halves were inoculated with mixtures of equal volumes of solutions containing the different $(NH_4)_2SO_4$-precipitates from sap of healthy White Burley tobacco leaves and the same T.M.V. preparation.

Opgelost neerslag na verzadiging van anjersap met $(NH_4)_2SO_4$ tot: *Dissolved precipitate from carnation sap after saturation with $(NH_4)_2SO_4$ to:*	Activiteits-% van de verdunning: *Activity-% from the dilution:*		
	0	10^{-1}	10^{-2}
33,3%	2,1	50,5	
50 %	0,0	9,5	56,4
80 %	0,0	9,6	
Onbehandeld anjersap *Untreated carnation sap*	0,0	3,5	37,7

$(NH_4)_2SO_4$ circa 10 % van de oorspronkelijk aanwezige inhibitor uit het anjersap wordt neergeslagen, bij 50%-ige verzadiging en hoger circa 50 tot 60 %. Op grond van deze resultaten kan worden gezegd, dat bij de zuivering van anjervirus volgens NOORDAM et al. (1951) door toevoeging van $(NH_4)_2SO_4$ met het virus tevens een zekere hoeveelheid inhibitor is neergeslagen. Deze hoeveelheid is echter òf onvoldoende geweest om de activiteit van het virus geheel of gedeeltelijk te onderdrukken, òf de inhibitor is verder geheel of gedeeltelijk door de op de precipitatie volgende aflopende dialyse verwijderd.

Gezien de door VAN DER WANT (1953) gepubliceerde gegevens, is het niet waarschijnlijk, dat bij zijn chromatografische scheidingsmethode een belangrijk deel van de inhibitor eerst bij de dialyse van de verschillende door elutie verkregen fracties is verwijderd. Op grond van eigen waarnemingen is namelijk een aflopende dialyse van virushoudend anjersap gedurende 16 h alléén niet voldoende om het infectievermogen van het virus op boon of tabak tot zijn recht te doen komen. Dat de door VAN DER WANT gevolgde chromatografische methode tot een volledige scheiding van virus en inhibitor heeft geleid, is echter niet bewezen. Wel is in het voorafgaande aangetoond, dat er in de oplossing geen sprake is van de vorming van een irreversibel complex tussen virus en inhibitor, daar bij gebruik van $(NH_1)_2SO_4$ in een hoeveelheid van 25 g/100 ml vloeistof het virus, bij of zonder aanwezigheid van een adsorbens, van het merendeel van de inhibitor wordt gescheiden.

4. GESCHEIDEN TOEDIENING VAN VIRUS EN ANJERINHIBITOR AAN HET TOETSOBJECT

4.1. Proeven

Bij een gescheiden toediening van de virus- en remstofhoudende oplossingen aan de toetsplant staan twee mogelijkheden open, namelijk ofwel men dient eerst de virusoplossing toe, waarna men met de remstofhoudende vloeistof de infectie weer ongedaan tracht te maken, ofwel men brengt het te inoculeren orgaan eerst in contact met de remstof en voert daarna pas de inoculatie uit. Het zal duidelijk zijn, dat bij het beproeven van beide mogelijkheden de tijdsduur tussen de afzonderlijke toedieningen een belangrijke en een te variëren grootheid is.

Bij de opzet der proeven diende rekening gehouden te worden met het feit, dat verschillende auteurs gewag maken van een beïnvloeding van de infectie door een behandeling van het geïnoculeerde blad met water. Zo maakt HOLMES (1929) melding van een stimulering van de infectie van *Nicotiana glutinosa* met tabaksmozaiekvirus, indien de bladeren onmiddellijk na de infectie met water worden afgespoeld. YARWOOD (1952) bevestigde dit verschijnsel voor boon. De laatste auteur constateerde echter, bij gebruik van 1% K_2HPO_4 bevattende virusoplossingen, een duidelijke vermindering van de infectie, indien de pas geïnoculeerde bonebladeren met water werden afgespoeld. Daarom werd er bij de uitvoering van de proeven zorg voor gedragen, dat de toets- en controlehelften der bladeren steeds een gelijk aantal keren met waterige oplossingen in contact werden gebracht. Teneinde een beïnvloeding van de infectie door de H-ionenconcentratie van het gebruikte anjersap te compenseren, alsmede om de osmotische waarde hiervan enigszins te benaderen, werden de controlehelften der bladeren bij de parallelbehandelingen niet met water, doch met fosfaatbuffer in contact gebracht.

In proeven, ter bepaling van de preventieve werking van de inhibitor op de infectie, werden aanvankelijk de helften der bladeren, na met carborundum te zijn bestrooid, hetzij met inhibitoroplossing, hetzij met waterige bufferoplossing ingewreven, met leidingwater afgespoeld en op verschillende tijden hierna met een virusoplossing in contact gebracht. Het aantal lokale vlekken, dat op deze wijze werd verkregen, was echter ook bij de controles uiterst gering, tot zelfs 0. Daar het zeer geringe succes van de inoculatie met de remstofvrije virusoplossing kennelijk het gevolg was van de vooraf te weeg gebrachte verwonding in aanwezigheid van water (zie ook YARWOOD (1952 a)) werden in het vervolg niet verwonde bladeren in de respectieve vloeistoffen gedompeld. Op deze wijze had VAN DER WANT (mondelinge mededeling) reeds vroeger een preventieve werking van de anjerinhibitor aangetoond, door namelijk bladeren van *Nicotiana glutinosa* even in anjersap te dompelen, direct met water af te spoelen en daarna te inoculeren met tabaksmozaiekvirus.

4.1.1. Uitvoering der proeven

Alle proeven werden verricht met afgesneden blaadjes van *Nicotiana glutinosa*. Toets en controle werden steeds op bij elkaar behorende bladhelften der bladeren vergeleken. Alle proefseries bevatten 10 bladeren. Als virus werd gebruikt gezuiverd tabaksmozaiekvirus (T.M.V.) en wel een waterige oplossing, die 16,5 γ T.M.V./ml bevatte. De inhibitorhoudende oplossing, waarmee werd

gewerkt, was onverdund sap van in diepvries bewaarde anjerspruiten, dat gedurende 45 min. bij maximaal 11.250 *g* was gecentrifugeerd. De pH van deze oplossing was 6,6. De bufferoplossing, waarin de controlebladhelften werden gedompeld, was een 0,02 Mol. fosfaatbuffer van pH 6,6 volgens Sörensen (zie: Lijst van Tabellen, uitgave der Kon. Ned. Chemische Vereniging, 17e druk, 1951, p. 174). Geïnoculeerd werd op dezelfde wijze als in II.3 is beschreven. Zowel direct na het inoculeren, als direct na het dompelen, werden de bladeren even in stromend leidingwater afgespoeld. Na het dompelen geschiedde dat aan weerszijden. De behandelde bladeren werden in petrischalen op vochtig filtreerpapier gelegd en in het licht van T.L.-lampen bij kamertemperatuur gezet.

Voor het dompelen der bladhelften werden twee methoden gebruikt, die door de duur der behandeling werden bepaald. Bij „even" dompelen werden de te behandelen bladhelften van een proefserie na elkaar helemaal in de vloeistof gedoopt en er onmiddellijk weer uit verwijderd. Deze dompeltijd bedroeg minder dan 5 sec. Indien de te behandelen bladhelften langer met de verschillende vloeistoffen in contact dienden te blijven, bijvoorbeeld 5 min. of meer, werden alle helften van een proefserie tegelijk met de geïnoculeerde bovenzijde op de vloeistof gelegd. Teneinde de bij elkaar behorende helften der bladeren terug te kunnen vinden en de benodigde vloeistof te beperken, werd hierbij gebruik gemaakt van een tweetal petrischalen, die met behulp van strookjes glas in 10 genummerde segmenten waren verdeeld. Bij het beëindigen der in de petrischalen uitgevoerde dompelingen, werden alle helften van een serie, ten behoeve van een uniforme dompeltijd, direct na elkaar uit de vloeistof genomen en op filtreerpapier gelegd en eerst daarna afgespoeld. Het dompelen en hierna volgend afspoelen werd steeds door twee personen tegelijk uitgevoerd. Een langere dompeltijd dan 15 min. werd niet beproefd, daar vooral zeer jonge blaadjes bij 15 min. dompelen een begin van beschadiging lieten zien.

De proefresultaten zijn naar analogie van de in hoofdstuk II (4.2.) gevolgde werkwijze weer in een percentage uitgedrukt, dat wij hier infectiepercentage zouden willen noemen. De betrouwbaarheid is weer onderzocht met de methode van Wilcoxon. Er is een onbetrouwbaarheidsdrempel van 0,03 aangehouden.

4.1.2. Resultaten bij toediening van de inhibitor na de inoculatie

Bij de eerste proeven, die werden uitgevoerd om vast te stellen of de inhibitor uit anjer ook een werking heeft ten aanzien van het tot stand komen der infectie als hij ná de inoculatie wordt toegediend (in het vervolg zal in dit verband van neutraliserende werking van de inhibitor worden gesproken), werden de bladhelften respectievelijk 5, 30, 60, 90, 120 en 180 min. na het inoculeren en afspoelen even in hetzij anjersap, hetzij bufferoplossing gedompeld en opnieuw afgespoeld. Reeds bij een tijdsverloop van 30 min. tussen inoculeren en nabehandelen bleek er bij even dompelen geen betrouwbaar effect van de anjerinhibitor op de infectie meer aan te tonen. Een tijdverloop van 5 min. gaf echter een duidelijk effect te zien. Het infectiepercentage van deze proefserie bedroeg namelijk 22,5 %. In een nieuwe proefreeks met intervallen van respectievelijk 5, 15 en 25 min. tussen inoculeren en even dompelen, werden voor alle series infectiepercentages kleiner dan 100 gevonden. Tevens bleek hier een duidelijke invloed van de leeftijd der planten, waarvan de bladeren waren genomen, op de grootte van het effect der nawerking. Daar er namelijk niet voldoende bla-

deren van planten van eenzelfde leeftijd voorhanden waren, werden behalve bladeren van jonge planten ook jonge bladeren van oudere planten gebruikt. De infectiepercentages van de bladeren der jonge planten nu, waren in eenzelfde proefserie aanzienlijk lager dan die van de bladeren der oudere planten. Gelijktijdig was met hetzelfde gemengde bladmateriaal ook een proef uitgevoerd, waarbij de tijdsduur tussen inoculeren en dompelen voor de verschillende series gelijk werd gehouden, namelijk 5 min.; de dompeltijden werden echter gevarieerd, deze bedroegen namelijk respectievelijk 5, 10 en 15 min.

Hierbij bleek, dat het maximale effect van de neutraliserende werking, bij een tijdsverloop van 5 min. tussen inoculeren en dompelen, reeds wordt bereikt bij een dompeltijd van 5 min. Tevens bleek bij alle series de omvang der neutraliserende werking opnieuw groter te zijn bij de bladeren der jonge planten dan bij die van de oudere.

Op grond van deze ervaringen nu werd een proef uitgevoerd met bladeren van jonge[1]) planten van dezelfde leeftijd, waarbij behalve het tijdsverloop tussen inoculeren en dompelen, tevens de lengte der dompeltijd werd gevarieerd volgens onderstaand schema (tabel 12). Ieder hokje vertegenwoordigt een proefserie, terwijl de cijfers hierin de infectiepercentages weergeven.

TABEL 12. Infectiepercentages van proefseries elk bestaande uit 10 afgesneden *Nicotiana glutinosa* bladeren. De toetshelften werden op wisselende tijdstippen na de inoculatie met T.M.V., gedurende uiteenlopende tijden, met sap van gezonde anjerplanten in contact gebracht. De controle-helften werden na inoculatie op overeenkomstige wijze met 0,02 Mol. fosfaatbuffer behandeld.

Table 12. Percentages of infectivity as determined by the half leaf method on detached Nicotiana glutinosa leaves. Test halves inoculated with T.M.V. (16,5γ virus/ml) were dipped during different periods in sap from healthy carnation plants at varying time intervals after inoculation. Control-halves were dipped in 0.02 Molar phosphate buffer (10 leaves per series).

Tijdsduur tussen inoculeren en dompelen *Time interval between inoculation and dipping*	Dompeltijd *Dipping period*				Rij no.*) *Row no.*)
	5 sec.	5 min.	10 min.	15 min.	
5 min. *5 min.*	9,1	1,7	0,7	2,5	1
	56,7	53,1	41,5	51,3	1′
15 min. *15 min.*	16,3	7,6	8,1	10,6	2
	42,7	53,1	55,2	53,6	2′
30 min. *30 min.*	32,1	12,5	12,5	13,1	3

*) Voor de rijen 1, 2 en 3 werden bladeren van jonge planten gebruikt, voor die van 1′ en 2′ bladeren van twee maanden oudere planten.
Figures of rows 1, 2 and 3 obtained with leaves from young plants, those of 1′ and 2′ with leaves from plants two months older.

In fig. 3 zijn de resultaten uit tabel 12, verkregen met de bladeren van de jonge planten, grafisch weergegeven. Hieruit blijkt onmiddellijk, dat de reeds eerder gesignaleerde kritische dompeltijd van 5 min., niet alleen bij een tijdsinterval van 5 min. tussen inoculeren en dompelen geldt, maar ook voor de intervallen 15 en 30 min. Tevens komt tot uiting, dat het effect der neutraliserende

[1]) De plantjes waren 39 dagen tevoren in een kistje verspeend, gebruik makend van een dicht plantverband. Groeitijd januari–februari.

werking afneemt, naarmate het tijdsverloop tussen inoculeren en dompelen toeneemt.

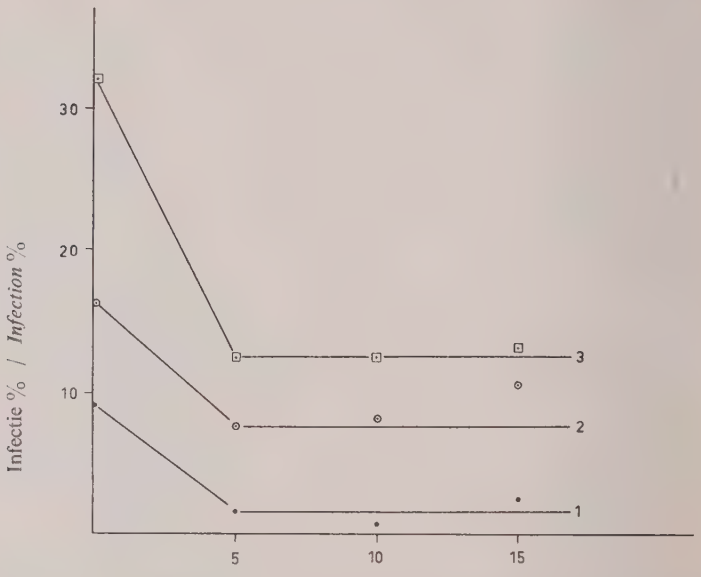


FIG. 3. Invloed van de verlenging der periode tussen inoculeren en dompelen in anjersap, op de infectie van jonge bladeren van *Nicotiana glutinosa* met T.M.V., bij dompeltijden van wisselende duur (zie ook tabel 12).
Punten op de ordinaat vertegenwoordigen een dompeltijd van 5 sec. Het anjersap was 45 min. gecentrifugeerd bij 11.250 *g* (10 bladeren per serie).
1: periode tussen inoculeren en dompelen 5 min.
2: idem 15 min.
3: idem 30 min.

Fig. 3. Effect of increasing time intervals between inoculation and dipping in carnation sap, at different periods, on the infection of young Nicotiana glutinosa leaves (see also table 12). Values on the ordinate represent a dipping period of 5 sec. The carnation sap was centrifuged during 45 min. at 11,250 g (10 leaves per series).
1: Time interval between inoculation and dipping 5 min.
2: Do 15 min.
3: Do 30 min.

In een soortgelijke proef met bladeren van niet uitgegroeide planten, die onder dezelfde omstandigheden hadden gestaan, maar twee maanden ouder waren, gaf de inhibitor eveneens een duidelijke, zij het aanzienlijk geringere neutraliserende werking te zien. Hier bleken de infectiepercentages (zie tabel 12) echter geen invloed te ondergaan van een verlenging der dompeltijd boven 5 sec., noch van een vergroting van het tijdsverloop tussen inoculeren en dompelen tot 15 min. Teneinde de invloed van de leeftijd der bladeren op het effect van de neutraliserende werking van de anjerinhibitor nog te kunnen bevestigen, werden bladeren van uitgegroeide circa 15 cm hoge *Nicotiana glutinosa* planten getoetst. Van ieder van 10 planten werden respectievelijk het eerste volgroeide

topblad, genummerd 1 en de lager staande bladeren, genummerd 3 en 5, afgesneden. De bladeren met hetzelfde rangnummer werden in één serie verenigd. Alle bladhelften werden 5 min. na het inoculeren gedurende 10 min. gedompeld. De infectiepercentages, zoals die voor de drie series berekend werden, bedroegen voor de bladeren 1, 3 en 5, respectievelijk 47, 49 en 70 %. Het leeftijdsverschil tussen de bladeren 1 en 5 kwam dus inderdaad tot uiting in een hoger infectiepercentage van de oudere bladeren.

Uit de resultaten der verschillende proeven volgt, dat de inhibitor uit anjer een duidelijk neutraliserende werking bezit ten aanzien van de besmetting van een plant met een virus. Het neutraliserende effect bleek in het algemeen duidelijk afhankelijk van het tijdsverloop tussen inoculeren en dompelen. De duur der nawerking was bij even dompelen niet langer dan circa 30 min.

De remstofwerking was voorts bij jonge bladeren sterker dan bij oudere. Bij eerstgenoemde werd ook een duidelijke invloed van de verlenging der dompeltijd op de grootte der infectiepercentages geconstateerd. De kritische dompeltijd lag hier tussen 0 en 5 min. Op de mogelijke betekenis van de waargenomen verschijnselen voor het remmingsmechanisme zal aan het slot van de volgende paragraaf worden ingegaan.

4.1.3. Resultaten bij toediening van de inhibitor vóór de inoculatie

Bij een preventief gebruik van de anjerinhibitor bleek deze in sterke mate en gedurende lange tijd het tot stand komen der virusinfectie te kunnen verhinderen. Even dompelen in anjersap, gevolgd door onmiddellijk afspoelen onder de kraan, had na 3 h nog een zeer sterk effect op de dan uitgevoerde infectie met T.M.V. ten gevolge. Zo waren de infectiepercentages in een proef bij een tijdsverloop van respectievelijk 1, 2 en 3 h tussen dompelen en inoculeren 5,0, 5,7 en 8,5. Het gemiddelde aantal vlekken per bladhelft in toets (teller) en controle (noemer) bedroeg respectievelijk $\frac{1}{54}$, $\frac{2}{38}$ en $\frac{3}{55}$. In een andere proef werden bij inoculatie, respectievelijk 1 en 2 h na dompeling uitgevoerd, infectiepercentages van 1,9 en 4,0 gevonden (gemiddeld aantal vlekken $\frac{3}{164}$ en $\frac{6}{156}$). Uit deze resultaten blijkt duidelijk, dat de remstof in zeer korte tijd door bladeren van *Nicotiana glutinosa* uit het anjersap kan worden opgenomen en vastgelegd. Ook blijkt de gebonden inhibitor gedurende lange tijd zijn activiteit te bewaren.

Ten aanzien van een verklaring der waargenomen verschijnselen bij gescheiden toediening van virus en remstof, kan het volgende worden gezegd. Gelet op het ontbreken van een aanwijsbare wisselwerking tussen virus en remstof in vitro is het door de laatste proeven wel zeer waarschijnlijk geworden, dat de inhibitor de virusinfectie via de toetsplant beïnvloedt. Het spoedig verminderen van de remstofwerking bij vergroting van het tijdsinterval tussen inoculeren en dompelen, zou kunnen inhouden, dat het virus al spoedig dat punt is gepasseerd, waar de remstof zijn blokkerende of verdringende functie kan uitoefenen. Men heeft dit verschijnsel ook wel willen verklaren (Bawden & Harrison, 1955) door aan te nemen, dat het virus reeds in de cel zou zijn doorgedrongen, terwijl de remstof, vanwege het herstel der aangebrachte wonden, hoe langer hoe moeilijker zou kunnen volgen. Dat dit probleem echter niet zo eenvoudig ligt, blijkt uit het door Jedlinski (1956) waargenomen verschijnsel, dat in sommige gevallen bij dompelen van vooraf verwonde bladeren in virushoudende oplos-

singen de besmetting, bij toenemend tijdsinterval tussen verwonden en dompelen tot 10 min., toeneemt in plaats van afneemt. De betekenis der verwonding voor de virusinfectie zal in hoofdstuk V nog kort worden belicht.

De eenvoudigste veronderstelling voor het begrijpelijk maken van de preventieve werking van de remstof is aan te nemen, dat deze zich op die plaatsen aan het blad hecht waar uiteindelijk het virus terecht moet komen om een infectie tot stand te brengen. Indien de remstof zich elders zou hechten, zou men tijdens de inoculatie een verdringingsmechanisme moeten veronderstellen, waardoor hij weer beschikbaar zou komen. Op deze wijze zou de inhibitor opnieuw in staat zijn andere, essentiële, plaatsen te bezetten, of tegelijk met het virus in de cellen binnen te dringen. Dit laatste mechanisme komt ons, wegens de zeer lage, zojuist genoemde infectiepercentages, weinig waarschijnlijk voor. Immers, remstof en virus zouden dan in de regel gelijktijdig een en dezelfde cel moeten binnendringen. Dat de remstof bij het dompelen onmiddellijk in de cellen zou doordringen, lijkt, gezien zijn moleculaire gewicht, evenzeer onwaarschijnlijk. De snelle vermindering der nawerking met toenemende tijd tussen inoculeren en dompelen zou in dit geval eveneens weinig begrijpelijk zijn.

5. BETEKENIS VAN DE EIWITMANTEL VOOR HET ZICH DOEN GELDEN VAN DE INHIBITOR UIT ANJER

5.1. Proeven

In de voorgaande paragrafen is gebleken, dat er in oplossing geen duidelijke en krachtige wisselwerking tussen inhibitor en virus bestaat, die resulteert in een complex, dat zich ook als zodanig manifesteert. Wel is het door de gebleken preventieve en neutraliserende werking van de inhibitor zeer waarschijnlijk, dat de remmende activiteiten via de plant tot stand komen.

Bij het zoeken naar een interpretatie van het remmingsmechanisme is in dit verband vooral gedacht aan een competitie tussen remstof en virus bij het bezetten van speciale posities nabij het bladoppervlak. De vraag dringt zich nu op, of de remstof zich kan doen gelden, vanwege de bijzondere eigenschappen van het oppervlak der virusdeeltjes. Een onderzoek in die richting was te meer aantrekkelijk, daar hierbij tevens de betekenis van dit oppervlak in de eerste fase van de infectie aan de orde zou komen.

Het virusoppervlak bestaat – naar algemeen wordt aangenomen en voor onder andere T.M.V. ook bewezen is – uit eiwit, dat de tweede macromoleculaire component: het nucleïnezuur (R.N.Z.), als een mantel omgeeft. Wij meenden in de nieuwste ontwikkelingen, die het onderzoek naar het wezen van het virus in zeer recente tijden heeft doorgemaakt, een prachtige mogelijkheid te hebben het gestelde probleem te benaderen. Door het fraaie werk van GIERER & SCHRAMM (1956), die erin slaagden uit T.M.V. infectieus nucleïnezuur te isoleren, werd het namelijk duidelijk, dat bij het virus het vermogen tot infectie, of anders gezegd het vermogen om de waard tot productie van nieuw virus te dwingen, gelokaliseerd is in dit nucleïnezuurdeel. Op grond hiervan werden door ons de volgende proeven gedaan. Bladhelften van *Nicotiana glutinosa*, die vooraf in een inhibitorhoudende oplossing waren gedompeld, werden geïnoculeerd met een nucleïnezuur-preparaat, bereid volgens de door bovengenoemde auteurs aangegeven methode, die op enkele ondergeschikte punten iets was gewijzigd. De in dezelfde inhibitoroplossing gedompelde controle-helften, werden ge-

inoculeerd met een T.M.V.-preparaat, dat naar infectieuziteit vergelijkbaar was met het nucleïnezuur-preparaat. Ook werd aandacht besteed aan de invloed, die het dompelen der bladeren als zodanig op het infectievermogen van het nucleïnezuur-preparaat had.

De eigenschap van de remstof om zich zeer gemakkelijk aan het blad te hechten, was voor een studie van de wisselwerking tussen inhibitor en nucleïnezuur bijzonder nuttig. Hierdoor kon immers dit fenomeen worden onderzocht, buiten aanwezigheid van in de remstofoplossingen nog voorkomende verbindingen als zuren, zouten en dergelijke, die voor het labiele R.N.Z. schadelijk zouden kunnen zijn. Tot slot werd nog de infectieuziteit van een oplossing, bestaande uit een mengsel van het nucleïnezuur-preparaat en een ten dele gezuiverd inhibitor-preparaat bepaald. De afwezigheid van nog intacte T.M.V.-deeltjes in het hier gebruikte nucleïnezuur-preparaat, werd in een uitgebreid electronenmicroscopisch onderzoek gecontroleerd. Bij oriënterende proeven was voor dit doel ook gebruik gemaakt van antiserum tegen T.M.V.

5.1.1. Uitvoering der proeven

Het T.M.V. was afkomstig van bladeren van met dit virus besmette White Burley tabak. De zuivering was, beknopt weergegeven, als volgt. Het sap werd even verhit op 60°C en bij laag toerental helder gecentrifugeerd. Hierna werd het virus twee maal uit zijn oplossing neergeslagen, namelijk éénmaal door verzadiging van het heldere sap met $(NH_4)_2SO_4$ tot 33,3 % en een tweede maal door aanzuren tot pH 3,5 met 10 %-ig azijnzuur van het in H_2O opgenomen $(NH_4)_2SO_4$-neerslag. Het in fosfaatbuffer opgenomen neerslag werd na centrifugering bij laag toerental, 70 min. bij 24.630 t./min. (50.188 *g*) in de preparatieve rotor van de ultracentrifuge behandeld. Het zo verkregen neerslag werd uiteindelijk opgenomen in 0,02 Mol. fosfaatbuffer pH 7,2. Het virusgehalte van dit preparaat werd spectrofotometrisch bepaald, door vergelijking van zijn optische dichtheid bij 262 mμ met een standaardcurve. Het bedroeg 7,9 mg virus/ml. Voor de inoculatieproeven werden de verdunningen 10^{-2} en 10^{-3} gebruikt.

Het nucleïnezuur werd verkregen door behandeling van het bovenbeschreven onverdunde T.M.V.-preparaat met waterige fenol (25 gew. % H_2O), volgens Gierer & Schramm (1956)[1]). 8 ml van de T.M.V.-oplossing werden achtereenvolgens met 8 en 6 ml van bovengenoemd fenol krachtig geschud, gedurende respectievelijk 8 en 6,5 min., waarna de ontstane emulsie werd gebroken door centrifugering bij 3000 t./min. (circa 700 *g*), gedurende 7 tot 12 min. in uitzwaaiende buizen. De bovenstaande waterige fase, die het nucleïnezuur bevat, werd telkens afgepipetteerd. Tijdens het schudden en het centrifugeren werd er zorg voor gedragen, dat de temperatuur van het reactiemengsel circa 0°C bleef. De waterige laag werd vervolgens herhaaldelijk uitgeschud met porties van 15 tot 20 ml van een gekoeld benzeen-ether mengsel (4 : 1 v/v), ter verwijdering van de fenol. Op aanwezigheid van fenol in de extractievloeistof werd gereageerd met een 3 %-ige waterige $FeCl_3$-oplossing. Nadat bij krachtig schudden van deze beide vloeistoffen geen paarskleuring meer optrad, werd de extractie

[1]) Daar in ondergeschikte punten van deze methode werd afgeweken en zij bovendien nogal summier door genoemde auteurs is weergegeven, wordt hier uitvoeriger op de gevolgde werkwijze ingegaan.

nog enige keren voortgezet, de laatste maal uitsluitend met ether. Onder koelen in smeltend ijs en doorleiden van N_2 werd tenslotte nog de achtergebleven ether uit de waterige R.N.Z.-oplossing geëvacueerd. De gehele bewerking nam 102 min. in beslag. De verkregen oplossing is geheel kleurloos, iets visceuzer dan water en licht opalescent. Voor de onmiddellijk hierna uitgevoerde inoculaties werd het onverdunde en het 10^{-1} verdunde R.N.Z.-preparaat gebruikt.

Er werden twee verschillende remstofhoudende vloeistoffen gebruikt, namelijk de oplossingen $A_{2.2}$ en $a_{1.1}$, beide verkregen in de loop van een proef ter isolering van de remstof op grotere schaal, door middel van ultracentrifugering (zie IV.2.1.1., vooral schema 1). Voor het dompelen der bladeren werd oplossing $A_{2.2}$ benut. Zoals uit genoemd schema kan worden afgeleid, bevat deze vloeistof naast remstof vooral de laagmoleculaire verbindingen van anjersap. Voor het mengen van zowel R.N.Z. als T.M.V. met inhibitor werd gebruik gemaakt van oplossing $a_{1.1}$ (1 vld $a_{1.1}$ + 4 vld H_2O). Gemengd werden gelijke volumina remstofhoudende oplossing en respectievelijk R.N.Z. en T.M.V. De mengsels werden onmiddellijk na het samenstellen geïnoculeerd.

Alle inoculaties werden uitgevoerd op afgesneden bladeren van *Nicotiana glutinosa*. Toets en controle werden op helften van eenzelfde blad vergeleken. Alle series bevatten 10 bladeren. Bij het dompelen werden de bladhelften even in de inhibitor-oplossing gedoopt en onmiddellijk daarna aan beide zijden met leidingwater afgespoeld. Vervolgens werden zij bestrooid met carborundumpoeder en respectievelijk 5 min. en 1 h na het dompelen met de R.N.Z.- of T.M.V.-houdende vloeistoffen geïnoculeerd en weer direct met leidingwater afgespoeld. Het uitstrijken van de betreffende vloeistoffen geschiedde met de vinger. Teneinde het effect van het dompelen als zodanig op de infectieuziteit van het R.N.Z. te bepalen, werden bij een serie de bladhelften in water gedompeld en verder behandeld als boven (inoculatie 5 min. na het dompelen). Zoals uit schema 1, pag. 297 blijkt, bevatte oplossing $a_{1.1}$ 1% NaCl. Om het effect van het zout op de infectieuziteit van R.N.Z. en T.M.V. te elimineren, werd in de series, waarbij de NaCl-houdende remstofoplossing werd gebruikt, aan de controle-vloeistoffen een gelijke hoeveelheid zout toegevoegd.

Het gebezigde microscoop was een Philips electronenmicroscoop type 100 KV.[1]) Als preparaathouders dienden kleine rechthoekige metalen plaatjes, voorzien van een kleine spleet. Hieroverheen was een vlies van formvar (polyvinylformal) aangebracht. De te onderzoeken oplossingen werden op twee verschillende wijzen opgebracht.

a. Volgens de druppelmethode. Hierbij wordt een druppel van de te onderzoeken vloeistof op het vlies gebracht en na enige minuten hiermee in aanraking te zijn geweest, voorzichtig met filtreerpapier afgezogen.

b. Volgens de vernevelingsmethode. Met behulp van een speciaal voor dit doel vervaardigd verstuivertje, brengt men de te onderzoeken oplossing in uiterst kleine druppels op het vlies. Tijdens het opbrengen houdt men de monding van het verstuivertje op circa 2 cm boven de preparaathouders.

Het op de preparaathouders opgebrachte materiaal werd onder een hoek van 14° met palladium geschaduwd. Onderzocht werden: onverdund R.N.Z., op-

[1]) Het electronenmicroscopisch onderzoek werd uitgevoerd door Mejuffrouw Dra. Chr. van der Scheer met assistentie van de heer S. Henstra, beiden verbonden aan de Landbouw Fysisch Technische Dienst te Wageningen. Voor hun welwillendheid en het met grote volharding en geduld verrichte speurwerk, wil ik hen op deze plaats hartelijk dankzeggen.

gebracht volgens de druppelmethode; 10^{-1} verdund R.N.Z., opgebracht door verstuiving; T.M.V. 10^{-2} en 10^{-3} verdund, beide laatste oplossingen werden zowel in druppels opgebracht als verstoven. Het doorzoeken van de preparaten geschiedde zowel visueel als aan de hand van talrijke fotografische opnamen. Een aantal van deze werd blind genomen, dus niet afgaande op wat met het oog op het scherm kon worden waargenomen.

5.1.2. Resultaten der proeven

Zoals in vroegere proeven was gebleken en ook nu weer werd bevestigd, bezat het nucleïnezuurpreparaat 1/100 tot 1/1000 van de activiteit van het T.M.V.-preparaat, waaruit het werd bereid. Daarom werden in de inoculatieproeven onverdund en 10^{-1} verdund R.N.Z. vergeleken met de T.M.V. verdunningen 10^{-2} en 10^{-3}. De resultaten hiervan en van de proefseries, waarin tevens de anjerinhibitor werd betrokken, zijn gerangschikt in tabel 13, pagina 292.

Uit de cijfers in de kolommen 3 en 4 blijkt onmiddellijk, dat, zo er al van enig verschil in gedrag van de remstof ten aanzien van respectievelijk R.N.Z. en T.M.V. sprake is, dit verschil zeer klein is. Van de in deze kolommen voorkomende quotiënten van rij 1, 2 en 4 geven bovendien slechts drie van de vijf een betrouwbare uitslag ten gunste van een grotere infectieuziteit van R.N.Z. Deze vijf series zijn uit de in totaal zeven gelicht, omdat hier de concentratieverhoudingen tussen R.N.Z. en T.M.V. een vergelijking toelaten. De waarnemingen van rij 3 zouden vooral belangrijk geweest zijn, indien de remstof slechts een gering effect op de infectieuziteit van R.N.Z. zou hebben gehad. De beide waarnemingen, weergegeven in kolom 2, rij 5 en 6, bevestigen, dat er nagenoeg geen verschil in de infectieuziteit is tussen R.N.Z. en T.M.V. bij aanwezigheid van anjerinhibitor. De infectiepercentages van beide mengsels bedragen namelijk respectievelijk 18,3 en 11,3.

Bij het beschouwen van de resultaten, weergegeven in kolom 3 en mogelijk ook in kolom 4, moet men rekening houden met het feit, dat het dompelen der bladeren vóór de inoculatie op de infectieuziteit van R.N.Z. een kleine stimulerende invloed heeft gehad (zie kolom 5). De depressie der infectieuziteit bij toevoeging van NaCl aan R.N.Z.-houdende oplossingen, zoals die blijkt bij onderlinge vergelijking van de waarnemingen in kolom 2, werd ook in vroegere proeven gevonden.

Als voorlopige conclusie van het hiervoor besprokene kan worden gesteld, dat ook al zou de infectieuziteit van het gebruikte R.N.Z.-preparaat nog voor een belangrijk deel aan onveranderd T.M.V. moeten worden toegeschreven, zich een wezenlijk ander gedrag van de anjerinhibitor tegenover R.N.Z. als tegenover T.M.V. toch nog in duidelijke verschillen tussen de aantallen lokale vlekken had moeten manifesteren. Gezien de hieronder te bespreken uitkomsten van het electronenmicroscopisch onderzoek en gezien enkele andere aanwijzingen, is dit voorkomen van onveranderd T.M.V. in grote hoeveelheden in het R.N.Z.-preparaat zelfs zeer onwaarschijnlijk.

Bij het intensieve onderzoek in de electronenmicroscoop van 12 preparaten, waarop R.N.Z. was opgebracht, werd geen enkel deeltje gevonden, dat het uiterlijk van onveranderd T.M.V. bezat. Zoals reeds gezegd, werd onverdund R.N.Z. en de verdunning 10^{-1} hiervan onderzocht. Daarentegen lieten preparaten met onbehandeld T.M.V. in de verdunning 10^{-2} en 10^{-3} (respectievelijk met 79 γ en

TABEL 13. Effect van de inhibitor uit anjer op het infectievermogen van T.M.V. en op het hiervan afkomstige ribonucleïnezuur (R.N.Z.). [1])

Table 13. Effect of the inhibitor from carnation on infectivity of T.M.V. and the ribonucleic acid (R.N.Z.) [1]) derived from it.

Gemiddeld aantal lokale vlekken van 10 bladhelften *Average number of local lesions from 10 half leaves*

Aard der getoetste oplossingen *Solutions tested*	Behandeling der bladhelften vóór inoculatie *Treatment of half leaves before inoculation*			
	Onbehandeld *Untreated*	5 min. tevoren gedompeld in inhibitoroplossing A 2.2 [3]) *Dipped 5 min. before in inhibitor solution A 2.2* [3])	1 uur tevoren gedompeld in inhibitoroplossing A 2.2. *Dipped 1 hr. before in inhibitor solution A 2.2*	5 min. tevoren gedompeld in H_2O *Dipped 5 minutes before in H_2O*
1	2	3	4	5
1 RNZ	121	8*	4,6*	–
TMV 79 γ/ml	142	3	1,5	–
2 RNZ	113	1	3*	132*
TMV 7,9 γ/ml	110	0,7	0	80
3 RNZ 10^{-1}	–	0,1*	0,4	–
TMV 79 γ/ml	–	2,3	0,5	–
4 RNZ 10^{-1}	50* [4])	0,1	–	–
TMV 7,9 γ/ml	203	0,3	–	–
5 RNZ + inhibitor [2])	6*	–	–	–
RNZ + NaCl 0,2%	40	–	–	–
6 TMV 79 γ/ml + inh.[2])	16*	–	–	–
TMV 79 γ/ml + NaCl 0,2%	137	–	–	–

[1]) R.N.Z. bereid uit een T.M.V.-preparaat dat 7,9 mg virus/ml bevatte.
R.N.Z. prepared from a T.M.V. solution containing 7.9 mg virus/ml.

[2]) De hier gebruikte inhibitorhoudende vloeistof was oplossing $a_{1\cdot1}$ (zie schema 1 p. 297) 1+4 verdund met H_2O. Het NaCl-gehalte hierin bedroeg 0,2%.
The inhibitor solution concerned was $a_{1\cdot1}$ (see scheme 1 p. 297) 1+4 diluted with H_2O. The NaCl content was 0.2%.

[3]) Zie schema 1 p. 297.
See scheme 1 p. 297.

[4]) Bij de quotiënten gemerkt * zijn de verschillen tussen de waarde in de teller en de noemer betrouwbaar volgens de symmetrietoets van WILCOXON (zie: II.4.2).
*The differences between numerator and denominator in the ratios marked * are statistical significant according to Wilcoxon's test for symmetry.*

7,9 γ virus/ml) zonder moeite de bekende staafvormige deeltjes zien. Alle R.N.Z.-preparaten werden aan de hand van het geprojecteerde beeld op het scherm grondig doorzocht. Daarnaast werden nog van 64 verschillende plekken fotografische opnamen gemaakt. Van een preparaat met onverdund R.N.Z. en een tweede met T.M.V. in de verdunning 10^{-2}, beide volgens de druppelmethode vervaardigd, werden in de blinde respectievelijk van 28 en 22 verschillende ge-

biedjes opnamen gemaakt. Op alle 22 foto's van het T.M.V.-preparaat kwamen typische staafvormige deeltjes voor. De aantallen varieerden van enkele tot zeer vele. Daarentegen leverden de 28 opnamen van het R.N.Z.-preparaat, zoals uit het bovenstaande blijkt, niet één zo'n deeltje op.

Het R.N.Z. had zich op de vliezen in het algemeen in twee karakteristieke vormen, afhankelijk van de wijze van opbrengen, afgezet, namelijk:

a. Bij vernevelen in langgerekte of ronde druppels, sommige met uitstulpingen en vaak met dikke, draadachtige uitlopers. Het inwendige der druppels bezat een draderige structuur, hetgeen vooral aan de omtrek duidelijk was.
b. Bij de druppelmethode in bandvormige formaties, eveneens met een draderige structuur. In foto 4 wordt een voorbeeld gegeven van een langgerekte druppel, alsmede een detailvergroting hiervan.

Het blijft natuurlijk mogelijk, dat in het inwendige der druppels en banden, intacte T.M.V.-deeltjes schuil gaan. Men zou dan echter mogen verwachten, dat ook minstens aan de randen dergelijke lichaampjes zouden kunnen worden waargenomen. Dat er inderdaad bij de behandeling met fenol in belangrijke mate een desintegratie van de T.M.V.-deeltjes heeft plaats gehad, gevolgd door een fractionering der splitsingsproducten, bleek uit enkele eenvoudige kleurreacties. 10 mm^3 van de fenol-fase, waarmee de uitgangs-virusoplossing de eerste maal geschud werd, gaf op filtreerpapier gebracht, een zeer sterke broomfenolblauwkleuring en een zeer duidelijke ninhydrinekleuring te zien. Daarentegen kleurde 10 mm^3 van het onverdunde R.N.Z.- preparaat met geen van beide. Als controle werd 10 mm^3 T.M.V.-oplossing in de verdunning 10^{-1} onderzocht. Het virus gaf een zeer duidelijke kleuring met broomfenolblauw en een zwakke ninhydrinekleuring.

De gevolgtrekkingen, die uit deze experimenten kunnen worden getrokken, zijn: De inhibitor uit anjer verhindert in gelijke, of nagenoeg gelijke, mate de infectie van *Nicotiana glutinosa* bladeren door zowel compleet T.M.V. als door het infectieuze R.N.Z. uit dit virus bereid. Op grond daarvan kan de eiwitmantel van het virus niet van wezenlijk belang zijn voor het zich doen gelden van de anjerinhibitor. Indien men aanneemt, dat de remming van het „complete" virus bereikt wordt, doordat de inhibitor bepaalde essentiële plaatsen nabij het bladoppervlak blokkeert, dan zou het verschijnsel der R.N.Z.-remming het eenvoudigst kunnen worden verklaard, door te veronderstellen, dat deze posities tevens van belang zijn voor het tot stand komen van de infectie door het nucleïnezuur. De functie der actieve plaatsen in de nabijheid van het bladoppervlak zou hierbij ten aanzien van compleet virus en R.N.Z. nog verschillend kunnen zijn (zie hoofdstuk V). Indien men zou willen stellen, dat de werking van de remstof een gevolg is van het blokkeren van bepaalde processen in de cel, dan zouden dat, gelet op de aard van het geremde agens (R.N.Z.), processen moeten zijn, die in verband met de virusvermeerdering staan. In dat geval zou het echter opnieuw niet duidelijk zijn, waarom de neutraliserende werking van de remstof zo snel afneemt met een toenemend tijdsverloop tussen inoculeren en dompelen.

6. SAMENVATTING

Het vermoeden, dat in hoofdstuk II aangaande het aangrijpingspunt van de inhibitor uit anjer werd uitgesproken, werd in dit hoofdstuk door de resultaten van een aantal experimenten van uiteenlopend karakter bevestigd.

Voor een wisselwerking tussen inhibitor en virus in vloeistofmilieu kon geen enkel argument worden gevonden. Daarentegen wijzen de proeven, waarbij de preventieve werking en de werking van de remstof achteraf op het tot stand komen der virusinfectie werden onderzocht, alsmede de experimenten met infectieus ribonucleïnezuur van T.M.V., op een werking van de inhibitor via de plant.

De anjerinhibitor bleek bij gebruik van *Nicotiana glutinosa* in gelijke mate werkzaam tegen R.N.Z. als tegen T.M.V.. Hieruit werd afgeleid, dat door de remstof te blokkeren posities nabij het bladoppervlak, ook voor het R.N.Z. van wezenlijk belang waren om zich als infectieuze eenheid te kunnen doen gelden.

In de loop van de verschillende onderzoekingen traden enkele waardevolle eigenschappen van de inhibitor aan het licht. In ultracentrifuge-proeven bleek, dat hij bij langdurig centrifugeren bij hoog toerental (254.000 *g*), een duidelijke neiging tot sedimenteren bezit. Hieruit kon een s_{20} van 1,4 worden bepaald, hetgeen wijst op een moleculairgewicht in de orde van minimaal 10.000. Ook bleek de remstof, bij verzadiging van zijn waterige oplossing met $(NH_4)_2SO_4$ tot 50 % en hoger, voor een belangrijk deel te worden geprecipiteerd.

HOOFDSTUK IV

ISOLERING EN KARAKTERISERING VAN DE INHIBITOR UIT ANJER

1. INLEIDING

Bij pogingen om te komen tot een afscheiding van het remmende principe uit anjer, werden wij voor de opgave geplaatst om uit een zeer samengestelde oplossing, namelijk een plantesap, een onbekende verbinding te isoleren.

De gestelde taak werd bemoeilijkt door de bijzondere eigenschappen, die de inhibitor bleek te bezitten. Zo is deze thermolabiel[1]) en gevoelig voor extreme pH-waarden. De oplosbaarheid in andere dan waterige oplosmiddelen is nihil. Indien hij tot precipitatie wordt gebracht, lost hij echter ook in water slechts moeilijk of niet op, vooral als het neerslag wordt gedroogd of als er geen anorganische ionen aanwezig zijn. Bovendien hoort hij, gezien zijn molecuulgrootte, thuis in het grensgebied van de klassieke organische chemie en van de chemie der macromoleculen. Door deze eigenschappen konden methodieken als extractie met organische oplosmiddelen, stoomdestillatie, vacuümdestillatie, (her)kristallisatie, gebruikelijk bij de isolering en zuivering van laagmoleculaire organische verbindingen, voor het afscheiden van de remstof niet worden toegepast. Ook was, zoals reeds gesuggereerd, de molecuulgrootte weer niet van dien aard, dat methodieken als ultracentrifugering en dialyse, geschikt voor het afzonderen van zeer grote moleculen, bij de inhibitor snel tot het gewenste resultaat leidden. Laatstgenoemde methode bleek in dit verband zelfs niet doeltreffend te zijn. Dialyseproeven hadden VAN DER WANT (1953) namelijk – zoals reeds gezegd – gebracht tot het poneren van twee typen van remstoffen in anjer, een dialyseerbare en een niet-dialyseerbare, een stelling die echter in dit onderzoek geleidelijk als onhoudbaar moest worden opgegeven.

Na een vergelijkend onderzoek werden tenslotte twee methoden uitgekozen voor de isolering van de inhibitor in actieve vorm. Bij de eerste methode werd een intensief gebruik gemaakt van de ultracentrifuge. Door langdurige centrifugeringen werd getracht de remstof af te scheiden, om hem vervolgens bij het oplossen te concentreren. De tweede methode was gebaseerd op de reeds in III.3.2.2. gesignaleerde eigenschap van de remstof om door $(NH_4)_2SO_4$ uit de waterige oplossing te worden neergeslagen.

Ter verdere karakterisering van de inhibitor werden sommige van de bij de isolering verkregen oplossingen in de analytische rotor van de ultracentrifuge onderzocht. Met eenzelfde doel en ter verdere zuivering werden enige van deze oplossingen tevens aan papierelektroforese onderworpen. In enkele gevallen werden de te elektrofereren vloeistoffen vooraf door gebruik van synthetische ionenuitwisselaars gefractioneerd.

De via papierelektroforese verkregen fracties van de verschillende inhibitor-

[1]) Kortstondige verhitting (10 minuten) bij 80 C doet de remstofactiviteit verloren gaan (VAN DER WANT, mondelinge mededeling).

houdende uitgangsvloeistoffen werden spectrofotometrisch gemeten en papierchromatografisch geanalyseerd. Deze laatste methodiek werd toegepast om de samengesteldheid van de fracties te kunnen onderzoeken. Een bepaalde verbinding, voorkomend in een oplossing met remstofwerking zou immers slechts dan met de inhibitor geïdentificeerd mogen worden, indien die oplossing ook inderdaad enkelvoudig van samenstelling was. Als enige werkelijk ondubbelzinnige karakteristiek voor de aanwezigheid van de inhibitor in een bepaalde fractie of oplossing, of een bepaald extract, werd de biologische werkzaamheid ervan aangehouden. Deze werd steeds getoetst ten aanzien van T.M.V. op afgesneden blaadjes van *Nicotiana glutinosa*. De consequentie van deze toetsmethode was, dat de lokalisering van de inhibitor, na iedere behandeling of fractionering van een remstof bevattende oplossing, minimaal twee dagen vergde.

2. ISOLERING VAN DE INHIBITOR UIT ANJER

2.1. Isolering door uitsluitende toepassing van ultracentrifugering[1])

Zoals in III.3.1. werd uiteengezet, verplaatst de remstof zich in een krachtig centrifugaal veld (bij ca. 250.000 *g*) duidelijk, zij het langzaam. Daar vanwege het vrij labiele karakter van de inhibitor gezocht moest worden naar zachtaardige isoleringsmethoden, scheen in dit verband de toepassing van ultracentrifugering veelbelovend. Niet alleen leek het mogelijk op deze wijze de inhibitor van de laagmoleculaire verbindingen uit anjersap te scheiden, maar tevens werd verwacht, dat de remstof aanzienlijk geconcentreerd zou kunnen worden. Door bovendien aan de langdurige centrifugering een kortstondige, eveneens bij hoog toerental, te laten voorafgaan en het hierbij ontstane neerslag te verwijderen, werd ook reeds een eerste fractionering van de hoogmoleculaire verbindingen verkregen. Een verdere scheiding werd bereikt door de geprecipiteerde inhibitor in een 1%-ige waterige NaCl-oplossing op te nemen. Het remstofhoudende neerslag werd hiertoe in de zoutoplossing gesuspendeerd en bij laag toerental (ca. 6000 *g*) helder gecentrifugeerd. Teneinde het effect van de bewerkingen te verhogen, werden de opeenvolgende centrifugeringen bij hoog- en laag-toerental eenmaal herhaald. Daar het niet mogelijk was met de preparatieve rotor te werken met een centrifugaal kracht boven 113.000 *g*, werd de tijd van centrifugeren ten opzichte van de in III.3.1.2. gebezigde verdubbeld, namelijk verhoogd tot 16 h. Vanwege deze zeer lange tijden werd de rotorruimte gekoeld op circa 0°C.

De reactie van de remstof op de verschillende bewerkingen werd – zoals reeds gezegd – nagegaan door bepaling van de biologische werkzaamheid der verschillende oplossingen. Behalve de remmende activiteit van de oplossingen der neerslagen, werd ook die der bovenstaande vloeistoffen bepaald. Deze laatste werden nog weer in verschillende fracties verdeeld. Enkele der hiervoor in aanmerking komende oplossingen werden ook in de analytische rotor van de ultracentrifuge onderzocht, om zo mogelijk een sedimentatiediagram van de remstof te verkrijgen (zie IV.3.). Ook werden deze fracties gebruikt voor het in genoemde paragraaf te beschrijven papierelektroforetisch onderzoek.

2.1.1. Uitvoering der proeven

De aard der verschillende bewerkingen, alsmede hun onderlinge opeenvol-

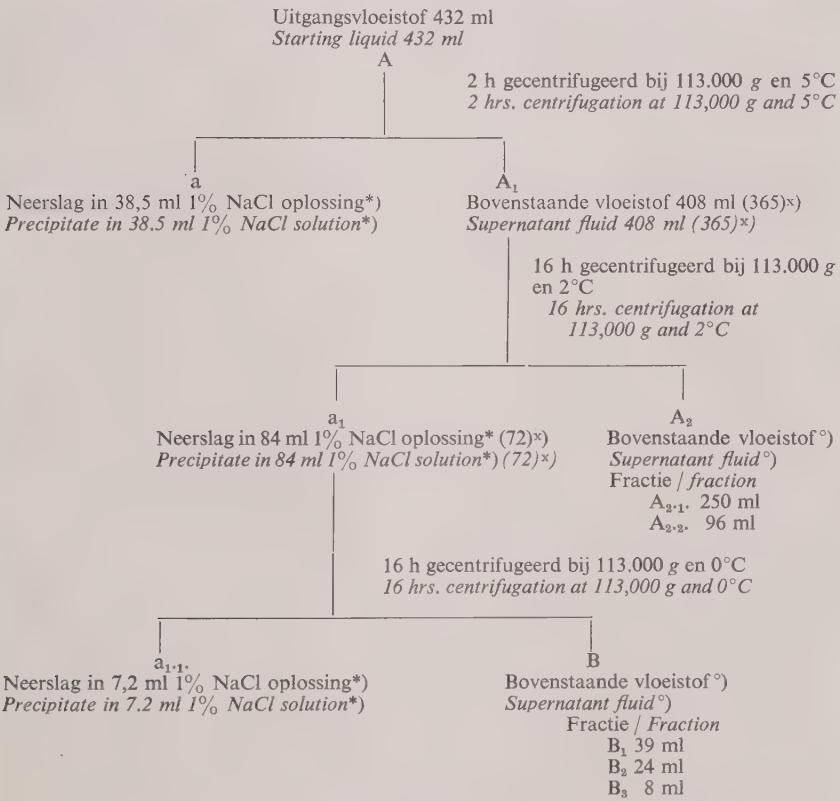
[1]) Voor gegevens betreffende de ultracentrifuge, zie III.3.1.1.

ging en de hierbij verkregen oplossingen, zijn in onderstaand overzicht 1 schematisch weergegeven.

Als uitgangsvloeistof werd sap van in diepvries bewaarde, ten dele verhoute anjerspruiten gebruikt, dat 45 min. gecentrifugeerd was bij 10.000 toeren/min. (12.500 *g*).

Indien de bovenstaande vloeistof na centrifugering in fracties werd afgenomen, zijn deze in de volgorde van boven naar beneden weergegeven. Alle bewerkingen werden in ononderbroken voortzetting uitgevoerd.

SCHEMA 1. Overzicht van de bewerkingen ter isolering van de remstof uit anjersap door ultracentrifugering en van de hierbij verkregen oplossingen.
Scheme 1. Diagrammatic representation of successive ultracentrifugation-experiments carried out to isolate the virus-inhibitor present in sap from carnation plants.


Uitgangsvloeistof 432 ml
Starting liquid 432 ml
A
2 h gecentrifugeerd bij 113.000 g en 5°C
2 hrs. centrifugation at 113,000 g and 5°C
a
Neerslag in 38,5 ml 1% NaCl oplossing*)
Precipitate in 38.5 ml 1% NaCl solution*)
A1
Bovenstaande vloeistof 408 ml (365)x)
Supernatant fluid 408 ml (365)x)
16 h gecentrifugeerd bij 113.000 g en 2°C
16 hrs. centrifugation at 113,000 g and 2°C
a1
Neerslag in 84 ml 1% NaCl oplossing* (72)x)
Precipitate in 84 ml 1% NaCl solution*) (72)x)
A2
Bovenstaande vloeistof °)
Supernatant fluid°)
Fractie / fraction
A2.1. 250 ml
A2.2. 96 ml
16 h gecentrifugeerd bij 113.000 g en 0°C
16 hrs. centrifugation at 113,000 g and 0°C
a1.1.
Neerslag in 7,2 ml 1% NaCl oplossing*)
Precipitate in 7.2 ml 1% NaCl solution*)
B
Bovenstaande vloeistof °)
Supernatant fluid°)
Fractie / Fraction
B1 39 ml
B2 24 ml
B3 8 ml

*) Na het suspenderen van de neerslagen in de opgegeven volumina, werden de oplossingen gedurende 45 min. bij laag toerental (ca. 6000 *g*) helder gecentrifugeerd.
Undissolved material has been removed by low speed centrifugation during 45 min. at 6,000 g.

x) Tussen haakjes geplaatste cijfers geven volumina weer, waarmee verder gewerkt werd.
Figures between brackets represent volumes taken for the next run.

°) Fracties van boven naar beneden afgepipetteerd.
Successive fractions taken from top to bottom.

Om een indruk te krijgen van de inhibitorconcentratie in de verschillende oplossingen, werden zowel van de onverdunde uitgangsvloeistoffen en van de hieruit na centrifugering verkregen oplossingen, als van de waterige verdunningen 10^{-1} en 10^{-2} hiervan, zekere volumina gemengd met een gelijk volume van een T.M.V.-preparaat (33 γ T.M.V./ml). Van deze mengsels werden vervolgens de activiteitspercentages bepaald op afgesneden bladeren van *Nicotiana glutinosa* (zie II.4.2.). De verkregen waarden werden vervolgens onderling vergeleken.

Een mogelijk invloed van het in diverse oplossingen aanwezige NaCl op het virus, werd door toevoeging van een equivalente hoeveelheid aan de controlemengsels gecompenseerd.

Alle proefseries bevatten vijf bladeren, die van de uitgangsvloeistof, bestonden uit zes bladeren.

Van sommige oplossingen werd het drogestofgehalte bepaald door indampen van een zeker volume in vacuo boven P_2O_5 en weging van het residu. Bij 1 % NaCl-houdende oplossingen werd de berekende hoeveelheid zout in mindering gebracht.

De oplossingen a_1, $A_{2\cdot2}$, $a_{1\cdot1}$ en B_3 werden op de reeds in III.3.1.2. beschreven wijze in de analytische rotor van de ultracentrifuge onderzocht. Van de sedimentatiediagrammen der oplossingen a_1, $a_{1\cdot1}$ en B_3 werden bovendien fotografische opnamen gemaakt. De oplossing $A_{2\cdot2}$, waarin de remstof in aanzienlijke concentratie voorkwam, bleek ondoorlatend voor licht. Hiervan konden zodoende langs optische weg geen sedimentatiegegevens verkregen worden.

2.1.2. Resultaten der proeven

De resultaten van de verschillende bewerkingen, zoals die in schema 1 zijn weergegeven, zijn overzichtelijk gerangschikt in tabel 14, blz. 299.

Uit deze tabel, kolom 5, blijkt, dat de hoeveelheden remstof, die na 16 h centrifugeren bij 113.000 *g* uit de bovenstaande vloeistof werden neergeslagen en in 1 % NaCl oplosten, rond 10 % bedragen (zie oplossingen a_1 en $a_{1\cdot1}$, respectievelijk neergeslagen uit A_1 en a_1). Het feit, dat bij de eerste korte ultracentrifugering gedurende 2 h een niet te verwaarlozen hoeveelheid remstof werd neergeslagen (zie oplossing a), zou erop kunnen wijzen, dat de inhibitor hier voor een deel, door bijvoorbeeld bestanddelen als chloroplasten, werd meegevoerd. Een absolute concentrering van de remstof is in de opgeloste neerslagen niet bereikt, wel echter in een fractie van een der bovenstaande vloeistoffen, namelijk in $A_{2\cdot2}$.

Rekening houdende met het drogestofgehalte is in de oplossingen a_1 en $a_{1\cdot1}$ echter wel een relatieve concentrering bereikt. Dit laatste is ook het geval bij oplossing B_2 en B_3.

Onder absolute concentrering moet een verhoging van de inhibitorconcentratie boven die in de uitgangsvloeistof A worden verstaan. Van relatieve concentrering wordt gesproken, indien de vermindering van het droogstofgehalte in de betreffende fractie groter is dan de achteruitgang van de remstofconcentratie.

De neerslagen, die met 16 h centrifugeren werden verkregen, hadden een glazig voorkomen en waren bruinzwart van kleur. De 1 % waterige NaCl-extracten hiervan waren na centrifugering bij laag toerental helder en bruin gekleurd. De bruine kleur was aanmerkelijk lichter dan die van de in de volgende paragraaf te bespreken opgeloste, met $(NH_4)_2SO_4$ verkregen, neergeslagen.

TABEL 14. Overzicht van de verdeling van de remstof over de verschillende oplossingen, bij isolatiepogingen door middel van ultracentrifugering (zie ook schema 1).
De activiteit van de remstof werd bepaald tegen T.M.V. op *Nicotiana glutinosa*. Gemengd werden gelijke volumina van de betreffende oplossingen (of verdunningen hiervan) en een T.M.V.-preparaat met 33 γ virus/ml gemengd (vijf bladeren per serie).

Table 14. The path of the virus-inhibitor in sap from carnation plants during two successive runs of high and low speed centrifugation (see also scheme 1).
Inhibitor activity determined against T.M.V. on Nicotiana glutinosa after mixing equal volumes of the solution concerned, (undiluted or diluted) and of a virus-preparation containing 33 γ T.M.V./ml (five leaves per series).

1	2	3	4	5	6
Aanduiding voor de oplossingen[1]) *Notation of the different solutions*[1])	Aantal ml *Number of ml*	Activiteits % verkregen met de verdunning 10^{-1} *Activity % using dilution 10^{-1}*	Inhibitorconcentratie in % van die in opl. A[4]) *Inhibitor concentration as % of that in solution A*[4])	Aanwezige inhibitor in % van de uitgangshoeveelheid[5]) *Inhibitor present as % of the starting amount*[5])	Droge stofgehalte in % (gew/vol) *Dry matter content in % (w/v)*
A	432	3,0	100	100	6,06
a	38,5	24,0	27	3	–
A_1	408	9,6	50	50	5,82
a_1	84	23,0	28	5,3	0,45
$A_{2\cdot1}$	250	21,0	29	20	4,53
$A_{2\cdot2}$	96	2,2 (24,6)[2])	230	60	6,94
$a_{1\cdot1}$	7,2	15,0	36	1	1,17
B_1	39	(16,2)[3]) 100	3,5	0,3	–
B_2	24	(2,9)[3]) 100	10	1	0,16
B_3	8	40,3	18	0,5	0,36

[1]) Voor de aard der vloeistoffen zie schema 1.
For the nature of the solutions see scheme 1.

[2]) Activiteitspercentage van de verdunning 10^{-2}.
Activity % determined with dilution 10^{-2}.

[3]) Activiteitspercentages van de onverdunde oplossingen.
Activity % determined with the undiluted solution.

[4]) Door interpolatie bepaald (op te vatten als benaderde waarden).
Determined by interpolation (to be interpreted as approximations).

[5]) Berekend uit de gegevens van kolom 2 en 4, rekening houdend met de diverse uitgangsvolumina (zie schema 1).
Derived from data in columns 2 and 4; the different starting volumes of scheme 1 have been considered.

2.2. Isolering door precipitatie met behulp van $(NH_4)_2SO_4$

Voor de mogelijkheid om de remstof door toevoeging van $(NH_4)_2SO_4$ aan anjersap uit de oplossing neer te slaan waren in III.3.2.2. voldoende aanwijzingen verkregen. Ook was gebleken, dat suspenderen van het door centrifugeren bij laag toerental verkregen neerslag in water, weer resulteerde in oplossingen met een sterke virusremmende werking. Zoals uit tabel 11 blijkt, was een toevoeging van het zout tot een verzadigingsgraad van 50 % voldoende om de inhibitor grotendeels neer te slaan.

Behalve de mogelijkheid om langs deze weg de remstof van laagmoleculaire verbindingen uit het anjersap te scheiden, leek deze methode tevens in principe geschikt om door opneming van het neerslag in een geringer volume dan het

uitgangsvolume, de inhibitor te concentreren. Daar $(NH_4)_2SO_4$ algemeen wordt gebruikt om eiwitachtige verbindingen uit hun oplossingen neer te slaan, was van deze methode niet te verwachten, dat zij, onder de heersende omstandigheden, ten aanzien van de hoogmoleculaire verbindingen bijzonder selectief zou zijn. Weliswaar is de verzadigingsgraad, waarbij bepaalde verbindingen neerslaan, voor uiteenlopende eiwitachtige stoffen verschillend, de hier gebezigde zoutconcentratie is in dit verband echter vrij hoog.

Om tot een verdergaande scheiding van hoogmoleculaire verbindingen te komen, werd de uiteindelijk verkregen remstofhoudende oplossing aan ultracentrifugering onderworpen. Er werd een zodanige centrifugeringsduur aangehouden (5 h), dat gezien de ervaringen in IV.2.1., verwacht kon worden, dat de remstof grotendeels in oplossing zou blijven.

Evenals in IV.2.1. werd ook hier de remstofactiviteit in de verschillende oplossingen, in de loop van het isolatieproces verkregen, tegen T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* getoetst. Op deze wijze kon weer een overzicht van de verdeling van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid inhibitor over de diverse vloeistoffen worden gegeven. Ook werden weer enkele oplossingen benut voor de in IV.3. te bespreken experimenten.

Met het oog op de onbekende hoeveelheden $(NH_4)_2SO_4$, die, onder andere via de neerslagen, in de verschillende oplossingen terecht kwamen, werden hiervan geen drogestofgehalten bepaald.

2.2.1. Uitvoering der proeven

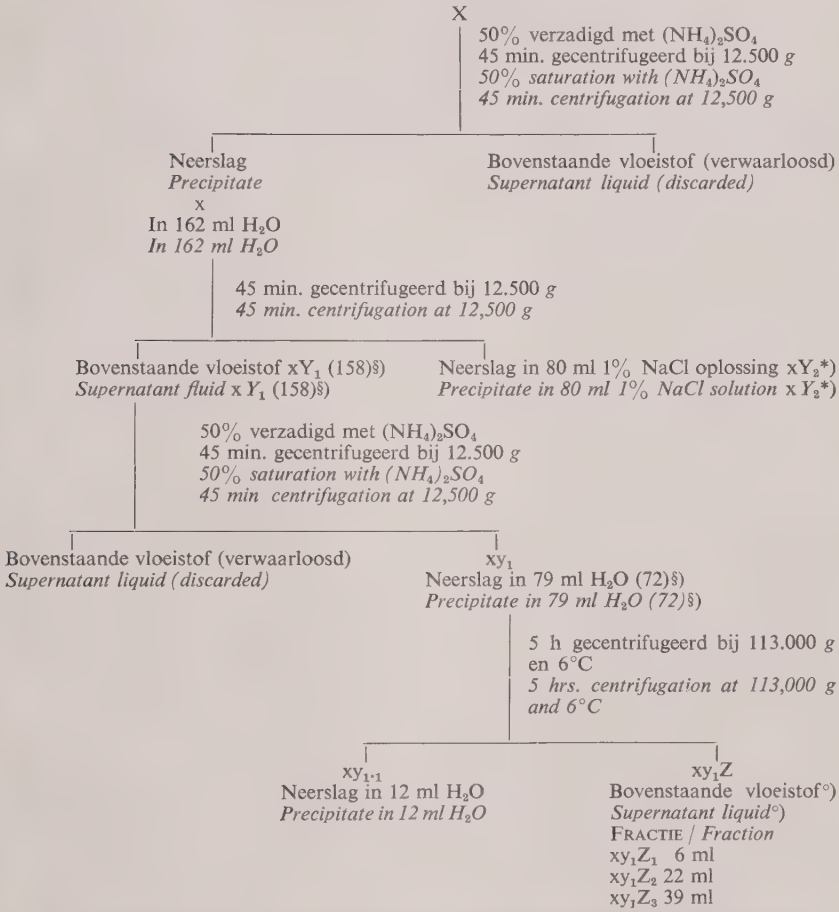
Het karakter der verschillende bewerkingen, de volgorde evenals de grootte en de aard van de verschillende oplossingen, blijken duidelijk uit onderstaand schema 2. Als uitgangsmateriaal diende dezelfde vloeistof als in 2.1.1. van dit hoofdstuk beschreven. Alle bewerkingen, inclusief het uitpersen van het sap, werden in een ononderbroken opeenvolging uitgevoerd. Het $(NH_4)_2SO_4$ werd in vaste vorm en in kleine porties onder schudden aan de vloeistof toegevoegd. Zowel tijdens als na de toevoeging van het zout bleef de vloeistof bij kamertemperatuur staan. Tussen de eerste toevoeging van $(NH_4)_2SO_4$ en het opnemen van het tweede zoutneerslag in water, lag een periode van circa 12 uur.

Zoals uit nevenstaand schema blijkt is, bij het opnemen van de beide $(NH_4)_2SO_4$-neerslagen x en xy_1 in water, het volume teruggebracht tot respectievelijk 1/5 en 1/10 deel van het uitgangsvolume. De bepaling van de inhibitoractiviteit is op geheel analoge wijze geschied, als in IV.2.1.1. aangegeven en de resultaten zijn ook op overeenkomstige wijze vergeleken. Uiteraard kon het remmend vermogen van de bovenstaande vloeistoffen, die met $(NH_4)_2SO_4$ tot 50 % waren verzadigd, niet worden onderzocht. Ter compensatie van het in de oplossing der neerslagen aanwezige $(NH_4)_2SO_4$ werd, bij de samenstelling van de controlevloeistof – voor zover nodig – de virusoplossing in plaats van met water met 1 % verzadigde oplossing van dit zout gemengd.

Van de oplossingen xy_1Z_2 en xy_1Z_3 werden sedimentatiediagrammen bepaald, die in IV.3.1. worden besproken.

SCHEMA 2. Overzicht van de bewerkingen ter isolering van de remstof uit anjersap door precipitatie met $(NH_4)_2SO_4$ en door ultracentrifugering, met vermelding van de hierbij verkregen oplossingen.x)

*Scheme 2. Diagrammatic representation of experiments carried out to isolate the virus-inhibitor in sap from carnation plants by $(NH_4)_2SO_4$-precipitation and ultracentrifugation.*x)


Uitgangsvloeistof 810 ml - Starting liquid 810 ml
X
50% verzadigd met (NH4)2SO4
45 min. gecentrifugeerd bij 12.500 g
50% saturation with (NH4)2SO4
45 min. centrifugation at 12,500 g
Neerslag
Precipitate
x
In 162 ml H2O
In 162 ml H2O
Bovenstaande vloeistof (verwaarloosd)
Supernatant liquid (discarded)
45 min. gecentrifugeerd bij 12.500 g
45 min. centrifugation at 12,500 g
Bovenstaande vloeistof xY1 (158)§)
Supernatant fluid x Y1 (158)§)
Neerslag in 80 ml 1% NaCl oplossing xY2*)
Precipitate in 80 ml 1% NaCl solution x Y2*)
50% verzadigd met (NH4)2SO4
45 min. gecentrifugeerd bij 12.500 g
50% saturation with (NH4)2SO4
45 min centrifugation at 12,500 g
Bovenstaande vloeistof (verwaarloosd)
Supernatant liquid (discarded)
xy1
Neerslag in 79 ml H2O (72)§)
Precipitate in 79 ml H2O (72)§)
5 h gecentrifugeerd bij 113.000 g en 6°C
5 hrs. centrifugation at 113,000 g and 6°C
xy1.1
Neerslag in 12 ml H2O
Precipitate in 12 ml H2O
xy1Z
Bovenstaande vloeistof°)
Supernatant liquid°)
FRACTIE / Fraction
xy1Z1 6 ml
xy1Z2 22 ml
xy1Z3 39 ml

*) Na het suspenderen van het neerslag in het opgegeven volume werd de oplossing gedurende 45 min. bij 12.500 *g* helder gecentrifugeerd.
Undissolved material has been removed by low speed centrifugation at 12,500 g for 45 min.

§) Tussen haakjes geplaatste cijfers geven volumina weer, waarmee verder werd gewerkt.
Figures between brackets represent volumes taken for the next treatment.

x) De neerslagen zijn met kleine letters aangeduid, de oplossingen hiervan zijn weergegeven door achter deze aanduiding nog een hoofdletter te plaatsen.
Precipitates are recorded by (a) small letter(s), solutions concerned by adding a capital to these notations.

°) Fracties van boven naar beneden afgepipetteerd.
Successive fractions taken from top to bottom.

2.2.2. Resultaten der proeven

De verdeling van de remstof over de verschillende oplossingen is weergegeven in onderstaande tabel 15.

TABEL 15. Overzicht van de verdeling van de remstof over de verschillende oplossingen, bij isolatiepogingen door middel van uitzouting met $(NH_4)_2SO_4$ en hierop volgende ultracentrifugering (zie ook schema 2).
De activiteit van de remstof werd bepaald tegen T.M.V. op *Nicotiana glutinosa*. Gemengd werden gelijke volumina van de betreffende oplossingen (of verdunningen hiervan) en een T.M.V.-preparaat met 33 γ virus/ml (vijf bladeren per serie).

Table 15. The path of the virus-inhibitor in sap from carnation plants during salting-out experiments with $(NH_4)_2SO_4$ followed by ultra-centrifugation (see also scheme 2). Inhibitor activity determined against T.M.V. on Nicotiana glutinosa after mixing equal volumes of the solution concerned (undiluted or diluted), and of a virus-preparation containing 33 γ T.M.V./ml (five leaves per series).

1	2	3	4	5
Aanduiding voor de oplossingen[1]) *Notation of the different solutions*[1])	Aantal ml *Number of ml*	Activiteits % verkregen met de verdunning 10^{-1} *Activity % using dilution* 10^{-1}	Inhibitor concentratie in % van die in oplossing X[2]) *Inhibitor concentration as % of that in solution X*[2])	Aanwezige inhibitor in % van de uitgangshoeveelh.[3]) *Inhibitor present, as % of the starting amount*[3])
X	810	3,6	100	100
xY_1	162	3,4	100	20
xY_2	80	5,5	74	7
xy_1	79	4	90	9
xy_1Z_1	6	73	6	0,1
xy_1Z_2	22	19	26	0,8
xy_1Z_3	39	9	53	3
$xy_{1\cdot1}$	12	6	70	1

[1]) Voor de aard der vloeistoffen zie schema 2.
For the nature of the solutions see scheme 2.
[2]) Door interpolatie bepaald (op te vatten als benaderde waarden).
Determined by interpolation (to be interpreted as approximations).
[3]) Berekend uit de gegevens van kolom 2 en 4.
Derived from data in columns 2 and 4.

Daar er, gezien de resultaten in III.3.2.2., een aanzienlijke hoeveelheid inhibitor bij de eerste $(NH_4)_2SO_4$-toevoeging moet zijn neergeslagen, werd zeer waarschijnlijk een belangrijk gedeelte tijdens het centrifugeren van het gesuspendeerde neerslag opnieuw geprecipiteerd. Hiervoor pleit ook de remstofactiviteit van de oplossing xY_2, het 1 % waterige NaCl-extract van dit precipitaat.

Wat de mogelijkheid tot concentrering van de remstof na precipitatie betreft, stuitten wij ook hier weer op de reeds herhaaldelijk ondervonden moeilijkheid van de matige oplosbaarheid van de uitgevlokte inhibitor. Verrassend is het daarom, dat tijdens de ultracentrifugering van het gesuspendeerde tweede $(NH_4)_2SO_4$-neerslag (oplossing xy_1) ongeveer 50 % van de remstof in oplossing is gebleven. Zowel het eerste, als het tweede $(NH_4)_2SO_4$-neerslag was bruin aardachtig van voorkomen en leverde na suspenderen en centrifugeren min of meer heldere, zeer donkerbruin gekleurde, waterige oplossingen op. De bovenstaande vloeistof van het tweede $(NH_4)_2SO_4$-neerslag (xy_1) was, in tegenstelling tot die van

het eerste neerslag (x), opvallend lichter bruin gekleurd. Voor de scheiding van remstof en donkerbruin gekleurde verbinding werd dan ook geen heil meer gezien in een herhaling van de $(NH_4)_2SO_4$-precipitatie.

3. KARAKTERISERING EN VERDERE ZUIVERING VAN DE INHIBITOR

3.1. Bepaling en analyse der sedimentatiediagrammen van enige oplossingen

In tegenstelling tot vroegere onderzoekingen, die geen optisch waarneembare sedimentatie hadden opgeleverd, konden bij de hier te bespreken experimenten met de analytische rotor van de ultracentrifuge sedimenterende bestanddelen worden waargenomen. Hieruit blijkt, dat de vermindering van het volume tot het vier-, respectievelijk tienvoudige bij de oplossingen a_1 en $a_{1\cdot1}$ van schema 1 en tot het tienvoudige bij de oplossingen xy_1Z_2 en xy_1Z_3 van schema 2 tot een aanzienlijke concentratie van hoogmoleculaire verbindingen heeft geleid. Onderzocht werden de oplossingen $A_{2\cdot2}$; a_1; $a_{1\cdot1}$ en B_3, besproken in IV.2.1.1. (zie schema 1) en de oplossingen xy_1Z_2 en xy_1Z_3, besproken in IV.2.2.1. (zie schema 2). De opzet der proeven was geheel gelijk aan die, beschreven in III.3.1. Er werd dus gecentrifugeerd bij 59.780 t./min. (gemiddeld 254.500 *g*). Tevens werd bij enige oplossingen na het beëindigen der centrifugering, de bovenstaande vloeistof in verschillende fracties afgenomen en biologisch getoetst.

Het was, gezien de concentratie van de remstof bijzonder jammer, dat bij onderzoek van oplossing $A_{2\cdot2}$ bleek, dat er geen licht door de vloeistofkolom in de cel werd doorgelaten. Hierdoor kon noch visueel, noch fotografisch, enige sedimentatie worden geregistreerd. Het onderzoek van de oplossing a_1 leverde twee kleine piekjes op, terwijl bij de centrifugering van de oplossingen $a_{1\cdot1}$ en B_3 de op foto 5 weergegeven diagrammen werden verkregen (series a en b). De oplossingen xy_1Z_2 en xy_1Z_3, hoewel vooral bij de aanvang van de centrifugering matig doorlatend voor licht, gaven één enkele zeer geprononceerde piek te zien. Voor oplossing xy_1Z_2 blijkt dit uit foto 5 (serie c).

De aan de hand van de fotografische opnamen te berekenen sedimentatieconstanten der verschillende componenten zijn in tabel 16 weergegeven. De in een zelfde kolom ondergebrachte grootheden behoren zeer waarschijnlijk aan identieke verbindingen toe. De onderlinge variaties zijn vermoedelijk ten dele een gevolg van verschillen in samenstelling en eigenschappen der vloeistoffen, waarin de sedimentatie werd bepaald. Deze verschillen zijn nog vergroot, doordat de temperaturen tijdens de diverse bepalingen niet gelijk waren (zie kolom 1). Ook de concentratie der componenten verschilde. De in kolom 5 gegeven sedimentatieconstanten werden berekend na biologische bepaling van de remstofverdeling in de bovenstaande vloeistof, aan het einde der centrifugering (zie III.3.1.2.). De aard van deze bepalingswijze brengt mee, dat de gegeven waarden aan de lage kant zijn.

Zoals reeds eerder is opgemerkt, werden alle in dit hoofdstuk beschreven proeven ter karakterisering en zuivering van de inhibitor, uitgevoerd met zeer donkerbruin gekleurde oplossingen. Tijdens de ultracentrifugeringen bleek, dat deze kleur gebonden was aan een langzaam sedimenterende verbinding. Ook werd geconstateerd, dat de scheiding tussen de nog slechts geel gekleurde vloeistoflagen en de bruinzwart gekleurde vloeistoflagen geheel of nagenoeg geheel

TABEL 16. Sedimentatieconstanten (s) van componenten voorkomend in oplossingen, die verkregen werden in experimenten ter isolering van de inhibitor uit anjer.

Table 16. Sedimentationconstants (s) of different compounds present in solutions, obtained in experiments to isolate the virus inhibitor from carnation.

Bepalingswijze van s: *Determination of s:*	Berekend uit sedimentatiediagrammen *By analysis of sedimentation-diagrams*				Via biologische toets *By a biological test*	
Kolom / *Column no.*	1	2	3	4	5	6
Aard der oplossingen[1]) *Kind of solutions*[1])	Temperatuur *Temperature*	s(α)	s(β)	s(γ)	s(inhib)	Temperatuur *Temperature*
a_1	22,8°C	22,5	−[2])	5,4		
$a_{1\cdot1}$	21,0	18,2	10,4	−[2])	2,3	22,5°C
B_3	19,5	−[2])	−[2])	4,1	1,4	23,5
xy_1Z_2	16,9	−[2])	−[2])	2,0	1,3	18,6
xy_1Z_3	21,2	−[2])	−[2])	3,1[3])		

[1]) Voor de herkomst van de vloeistoffen, zie schema 1 en 2.
For the origin of the solutions, see scheme 1 and 2.

[2]) Verbinding niet voorkomend in de betreffende oplossing.
Compound not present in the solution concerned.

[3]) Bepaald door centrifugering van de waterige verdunning 10^{-1} van oplossing xy_1Z_3.
Determined by centrifuging solution xy_1Z_3 10^{-1} diluted with water.

samenviel met de grens tussen remstofvrije of althans zeer remstofarme en remstofrijke vloeistoflagen. Dit met het blote oog gemakkelijk waarneembare en ook vrij-stabiele scheidingsvlak werd dan ook bij het fractioneren der bovenstaande vloeistoffen steeds benut. Er is nu alle reden om aan te nemen, dat de sedimentatieconstanten in kolom 4 (tabel 16) aan deze hoogmoleculaire bruingekleurde verbindingen dienen te worden toegeschreven. Daar de remstofconcentratie in de oplossingen, die sedimentatiediagrammen opleverden, niet hoger was dan in onbehandeld anjersap, is het niet waarschijnlijk, dat de inhibitor zelf aanleiding tot het verschijnen van een piek zou geven.

Op grond van bovenvermelde feiten kan wel worden geconcludeerd, dat de orde van grootte van de sedimentatieconstante, zoals die met behulp van de biologische toets voor de remstof bepaald werd, juist is. Ten overvloede zij er nog op gewezen, dat het dus onmogelijk is door ultracentrifugering alléén de remstof van de gekleurde component te scheiden. Het vermoeden is zelfs gewettigd, zoals uit de volgende paragraaf zal blijken, dat de remstof enige affiniteit voor de gekleurde verbinding bezit.

3.2. Papierelektroforetisch onderzoek

Met het oog op de mogelijkheden tot verdere zuivering van de inhibitor was het onder andere belangrijk te weten, in hoeverre deze al of niet een ionair karakter bezit, althans bij bepaalde zuurgraad kan bezitten. Als methodiek, geschikt om hierover inlichtingen te verschaffen, werd gedacht aan papierelektroforese. Deze methode is namelijk betrekkelijk eenvoudig en kan worden uitgevoerd met kleine hoeveelheden materiaal. Bovendien is het een voordeel, dat de bereikte scheiding gemakkelijk kan worden gefixeerd. Dit kan geschieden door het in stukken knippen van de natte elektroferogrammen of door snelle droging van de intact gelaten stroken. De methode zou in feite slechts van

waarde zijn, indien de remstof gedurende het verblijf in het elektrische veld zijn activiteit zou behouden.

Inderdaad bleek bij een eerste proef, uitgevoerd bij kamertemperatuur, een spanning van 100 V en een pH van 6,7, dat de extractie van een zone van het elektroferogram op enige afstand van de plaats, waar de remstofhoudende oplossing was opgebracht, een vloeistof met inhibitorwerking opleverde. De verplaatsing was in de richting van de kathode. Op grond van dit resultaat werd een uitvoerig onderzoek uitgevoerd, waarbij diverse variaties in de proefomstandigheden werden aangebracht.

De tijdens de papierelektroforetische behandeling van de remstofhoudende oplossingen bereikte fractionering werd op verschillende wijzen gecontroleerd. Allereerst werd de biologische toetsmethode toegepast, verder werden ook de verschillende componenten via hun fluorescentie-eigenschappen en door kleuringen gelokaliseerd. Tevens werden de extracten van bepaalde delen van sommige elektroferogrammen spectrofotometrisch en papierchromatografisch onderzocht.

De papierelektroforese werd dus niet alleen als analysemethode gebruikt, maar eveneens als preparatieve methode op semi-micro schaal. Het papierelektroforetische onderzoek werd besloten met enkele proeven, waarbij de te onderzoeken vloeistoffen vooraf met synthetische ionenuitwisselaars waren behandeld.

3.2.1. Methodieken en uitvoering der proeven

Methodieken.

Papierelektroforese.

De elektroforese werd uitgevoerd in een ruime, door een los deksel af te sluiten bak van 45 × 37 × 17 cm, vervaardigd van perspex, waarin de opgehangen stroken vrij in contact stonden met de atmosfeer in de afgesloten ruimte (de zogenaamde *open strip* methode). De kathode- en anode-ruimten bevonden zich aan weerszijden tegen de lange zijwanden op de bodem van de elektroforesebak. De breedte en de hoogte hiervan bedroegen 2,5 × 3 cm. Tegen de kathode- en anode-ruimten bevonden zich overeenkomstige trogvormige ruimten. Over de binnenste opstaande wanden hiervan werden de uiteinden der papierstroken gehangen. Deze werden verder nog in het midden ondersteund door een horizontale glasstaaf, die op gelijke afstanden van de lange zijden van de bak op 13,2 cm boven de bodem was aangebracht. Elk der elektroderuimten en de hieraan grenzende ruimten werden tot een gelijk niveau met bufferoplossing (ca. 300 ml elk) gevuld. De beide aangrenzende ruimten stonden via filtreerpapierbrugjes met elkaar in contact. Het nog vrije gedeelte van de bodem van de bak werd met een dunne laag buffer bedekt om verzadiging van de ruimte met waterdamp te vergemakkelijken.

De elektroden waren vervaardigd van Pd-draad.

Het elektrische voedingsapparaat was een gestabiliseerd plaatstroomapparaat (P.S.A.) met regelbare uitgangsspanning tussen 200 en 360 V.

De elektroforese werd uitgevoerd op stroken Whatman no. 3 MM papier van 41 bij 4 cm. Maximaal konden 8 van deze stroken gelijktijdig aan elektroforese worden onderworpen.

Vóór het opbrengen van de te elektroforeren vloeistoffen werd elk der helften van een strook tot 2,5 cm van het midden in de bufferoplossing gedoopt. Hierna werd op het midden (= oorsprong) over de volle breedte van de strook, met behulp van een pipet 0,1 ml van de te onderzoeken vloeistof, op het ter plaatse dus droge filtreerpapier, opgebracht. Vanuit de met bufferoplossing bevochtigde delen van de strook stroomde deze van weerskanten naar de oorsprong, waardoor de te elektroforeren componenten nog op een kleiner gebied werden samengedrongen. De snelheid, waarmee de buffervloeistof naar de oorsprong stroomde, was zodanig, dat bij de gekozen omstandigheden een en dezelfde persoon de bewerkingen van dompelen der stroken en opbrengen der oplossingen kon uitvoeren. Er dient uiteraard voor te worden gewaakt, dat de van weerszijden naar de oorsprong toe bewegende bufferoplossingen deze gelijk-

tijdig bereiken. Anders wordt de opgebrachte vloeistof van de oorsprong afgedrongen. Deze wijze van opbrengen werd gevolgd, omdat het wegens de achteruitgang van de activiteit van de remstof tijdens de elektroforese nodig was een vrij groot volume van de inhibitorhoudende oplossing te onderzoeken. Om dezelfde reden werd van het dikke Whatman no. 3 papier gebruik gemaakt. Na het opbrengen der oplossingen werden de stroken op de reeds beschreven wijze in de elektroforese-ruimte gehangen. De uiteinden der stroken bevonden zich dan tot 3,5 cm in de bufferoplossingen.

De elektroforese werd uitgevoerd bij circa 0°C.

De gebezigde spanningen varieerden van 100 tot 360 V, de stroomsterkte per strook bedroeg maximaal 2 mA.

De elektroforese-tijden liepen uiteen van 8 tot 16 h.

Het drogen der stroken werd uitgevoerd bij circa 110°C gedurende 10 tot 15 min.

Geëlektroforeerd werd in een pH-gebied van 5,4 tot 8,1. Voor de pH-waarden 5,4; 6,7 en 7,8 werd gebruik gemaakt van fosfaatbuffers volgens Sörensen van 0,033 Mol., voor pH 8,2 werd een boorzuur (0,1 Mol.)-borax (0,025 Mol) buffer, volgens Palitzsch gebruikt (zie voor de samenstelling van beide typen buffers: „Lijst van tabellen", uitgave der Kon. Ned. Chemische Vereniging, 17e druk, 1951, blz. 172 en 174).

Om de verplaatsing van een verbinding uitsluitend ten gevolge van vloeistofstroming door endosmose en verdamping te kunnen bepalen, werd glucose aan elektroforese onderworpen. Opgebracht werd 0,1 ml van een waterige oplossing, die 2,5 mg/ml bevatte.

Fluorescentie en kleuringen.

Voor het lokaliseren van ongekleurde verbindingen, met name eiwitten, peptiden en aminozuren in gedroogde elektroferogrammen en papierchromatogrammen werd gebruik gemaakt van de eigenschap, dat deze verbindingen, indien zij op filtreerpapier enige tijd op 110°C worden verhit, een duidelijke fluorescentie in ultraviolet licht vertonen. Daarbij werd gebruik gemaakt van een Philips (HPW 125 Watt, type 57202 E 70) ultraviolet lamp.

Op genoemde verbindingen werd ook een kleurreactie uitgevoerd met behulp van een 0,2% (gew. %) ninhydrineoplossing in watervrije n-butanol. Indien bij de elektroforese een bufferoplossing met pH $>$ 7 was gebruikt, werd aan de ninhydrineoplossing nog 1% ijsazijn (vol./vol.) toegevoegd. In basisch milieu is de ninhydrinekleuring namelijk slechts zeer zwak (Consden & Gordon, 1948). Na het besproeien der chromatogrammen met de ninhydrineoplossing of het dopen der elektroferogrammen hierin, werden deze gedurende 5 tot 10 minuten bij 90°C verhit. Alle aminozuren en sommige peptiden en eiwitten geven een kleuring, in de meeste gevallen paars.

Voor het aantonen van eiwitten werd verder nog de broomfenolblauwkleuring volgens Durrum (1950) gebezigd. De gedroogde stroken werden 15 minuten in een alcoholische oplossing van 1,14 g broomfenolblauw en 10 g $HgCl_2$ per 100 ml 96%-ige ethanol gedompeld en vervolgens ter verwijdering van de niet aan eiwit gebonden kleurstof 5 minuten in water gespoeld.

Op reducerende suikers werd gereageerd met anilinefosfaat volgens Gaillard (1954). Het reagens wordt bereid door 0,27 ml aniline en 0,36 ml 85%-ig H_3PO_4 elk in 15 ml met H_2O verzadigde butanol op te lossen en de fosforzuur-oplossing onder schudden bij de aniline-oplossing te druppelen. Na het besproeien wordt het filtreerpapier kort op 100°C verhit. Bij te lang verhitten kleurt het hele papier geel en gaat de duidelijkheid der vlekken achteruit.

Spectrofotometrie.

Extracten van zones der elektroferogrammen werden onderzocht in een Zeiss spectrofotometer met monochromator M4Q. De gebruikte kwartscuvetten hadden een inhoud van circa 0,6 ml. De weg, die het licht door de vloeistofkolom moest afleggen bedroeg 2 mm. De metingen werden verricht tegen de bufferoplossing, die ook voor elektroforese en extractie was gebruikt. Het doorgemeten golflengtegebied liep van 230–300 mμ.

Papierchromatografie.

Toegepast werd de afdalende methode. Alle eendimensionale chromatogrammen werden ontwikkeld met een mengsel van 7,5 gewichtsdelen fenol en 3 volumedelen fosfaatbuffer pH 6,7 en 0,033 Mol. (volgens Sörensen). Aan de fenol werd buffervloeistof in plaats van water toegevoegd, om de in de extracten der elektroferogrammen voorkomende bufferzouten te compenseren.

Bij de tweedimensionale chromatogrammen werd als eerste ontwikkelvloeistof het mengsel fenol-bufferoplossing gebruikt en als tweede loopvloeistof een mengsel collidine-lutidine-water (2:8:7 volumedelen). De door het gebruik van het eerste oplosmiddel na droging in het papier achtergebleven zouten stoorden de ontwikkeling met het collidine-lutidine-mengsel in het geheel niet. De verschillende ontwikkelvloeistoffen werden door verhitting van de chromatogrammen op 90°C in een stoof, gedurende circa 45 minuten, onder doorleiding van lucht, verwijderd.

De chromatogrammen ter scheiding van de suikermengsels werden alle eendimensionaal met het fenol-buffervloeistofmengsel ontwikkeld.

Hydrolyse.

Voor de hydrolyse der eiwitachtige verbindingen, werden de verschillende oplossingen met een gelijk volume geconcentreerd HCl gemengd en 16 h bij 103°C in toegesmolten glazen buisjes verhit.

Hydrolyse van verbindingen met polysaccharide karakter werd bereikt door aanzuren van de oplossingen met geconcentreerd HCl tot 2N en verhitten gedurende 2 h bij 103°C, eveneens in toegesmolten buisjes.

Na de hydrolyse werden de reactiemengsels in vacuo boven NaOH en P_2O_5 drooggedampt. Indien er bij de hydrolyse onoplosbare verbindingen waren ontstaan, werden deze vóór het indampen door afzuigen van de hydrolysaten over een hard filter verwijderd.

De na droogdamping achtergebleven residuen werden in dubbel gedestilleerd water opgenomen en deze oplossingen werden gebruikt voor het chromatografisch onderzoek.

De door Gaillard (1954) gevolgde methode om de reactiemengsels na hydrolyse met 1 N H_2SO_4 als zodanig op het papier te brengen en te chromatograferen, bleek voor HCl hydrolysaten niet mogelijk. Bij het opbrengen van 20 mm^3 van een 2 N HCl oplossing op de gebruikelijke wijze, dat wil zeggen in porties van circa 3 mm^3 en telkens drogen van de opgebrachte druppel met behulp van een infrarood lamp, bleek het papier namelijk zodanig te worden aangetast, dat er na chromatografie en de hierna volgende kleuring, een zeer duidelijke glucosevlek, een zeer diffuse arabinosevlek en een intensieve bruine vlek op de oorsprong verscheen.

Uitvoering der proeven.

De volgende inhibitorhoudende oplossingen, afkomstig van de in IV.2. beschreven isolatieproeven, werden aan papierelektroforese onderworpen: $A_{2\cdot2}$ en $a_{1\cdot1}$ (zie schema 1) en xy_1Z_2 en xy_1Z_3 (zie schema 2).

De elektroforesebak was opgesteld in een ruimte, die op ongeveer 0°C gekoeld werd, daar verlaging van de temperatuur waarbij geëlektroforeerd werd, een gunstig effect bleek te hebben op het behoud van de inhibitoractiviteit.

Voor de hoogste pH-waarden werd speciaal een boorzuurbuffer gekozen, omdat ongeladen verbindingen met polysaccharide-karakter door verestering met dit zuur een anion-karakter krijgen. Hiertoe dienen in de samenstellende monosen cisstandige hydroxylgroepen aan aangrenzende C-atomen voor te komen.

Teneinde de remstof in de elektroferogrammen ondubbelzinnig te kunnen lokaliseren, werden na iedere elektroforese één of meer van de natte stroken in stukken geknipt. Deze stukken werden na toevoeging van buffervloeistof uitgeperst. Van de zo verkregen persvloeistoffen werd een deel gemengd met een gelijk volume T.M.V.-houdende oplossing (33 γ virus/ml) en op de gebruikelijke wijze op helften van vijf *Nicotiana glutinosa* bladeren getoetst. Op de controlehelften werden T.M.V.-buffermengsels uitgestreken.

Om de verdeling der natte elektroferogrammen niet in den blinde te moeten doen, werd steeds één strook vooraf gedroogd en ter lokalisering van de fluorescerende verbindingen in ultraviolet licht bekeken. Aan de hand van de op het droge elektroferogram ingetekende zones met dergelijke verbindingen, werden

vervolgens de natte stroken verdeeld. De lokalisering met behulp van ultraviolet licht werd gekozen boven een kleurmethode, omdat dan de tijd tussen het beëindigen der elektroforese van de te drogen strook en van de in stukken te verdelen stroken, zo klein mogelijk was. Die tijd bedroeg maximaal 20 min.

Teneinde bij het in stukken knippen der natte stroken de plaats der verschillende zones gemakkelijk te kunnen situeren, waren aan weerszijden van de oorsprong over de breedte der elektroferogrammen een tiental potloodstrepen aangebracht, op onderlinge afstand van 1 cm. Identieke zones werden bij elkaar in kleine bekerglaasjes overgebracht. Vóór het uitpersen werd bufferoplossing toegevoegd in een hoeveelheid van gemiddeld 0,1 ml per 4 cm^2 strook. De zones werden door aandrukken met een glasstaaf goed in contact gebracht met de extractievloeistof, echter zonder het papier tot pulp te verdelen. Vervolgens werden zij door middel van een handpersje uitgeperst. De hoeveelheid persvloeistof werd door weging bepaald. Per zone bedroeg deze gemiddeld 1,5 maal de hoeveelheid toegevoegde bufferoplossing. Zowel voor de extractie als de elektroforese werd eenzelfde bufferoplossing gebruikt.

Op de gedroogde elektroferogrammen werden steeds verschillende kleurmethoden beproefd. Hiertoe werden zij overlangs in twee, zo nodig, in drie stukken verdeeld.

De verkregen extracten werden, zoals reeds opgemerkt, behalve voor biologische toetsing ook gebruikt voor spectrofotometrische metingen en papierchromatografie. Afhankelijk van de optische dichtheid, werden de extracten bij de spectrofotometrie onverdund of in de verdunning 1 : 1 gebruikt.

Papierchromatografisch onderzoek werd zowel aan de ongehydrolyseerde als aan de gehydrolyseerde extractievloeistoffen verricht. Bij aanwezigheid van vezels hierin, ten gevolge van het uitpersen der zones, werden de vloeistoffen voor de hydrolyse over een hard filter afgezogen. Van de te chromatograferen oplossingen werden volumina opgebracht, overeenkomend met 20 tot 90 mm^3 van de corresponderende extractievloeistoffen. Die hoeveelheden werden in porties van 2 tot 3 mm^3 op een bepaalde plaats van het chromatogram gepipetteerd, waarbij de natte vlek telkens onder een infraroodlamp werd gedroogd. Er werden ook gehydrolyseerde extracten van blanco elektroferogrammen gechromatografeerd. In plaats van een of andere oplossing was hier vóór de elektroforese H_2O opgebracht. In eendimensionale chromatogrammen werd steeds naast de verschillende oplossingen, ook een mengsel van synthetische verbindingen gechromatografeerd, hetzij suikers, hetzij aminozuren.

In een aantal proeven werden van de oplossingen $A_{2\cdot2}$, xy_1Z_2 en xy_1Z_3 kleine volumina (3 tot 5 ml) in contact gebracht met ionenuitwisselaars van het type amberlite IR-120 H en IRA-400 OH (respectievelijk een sterke kationen- en anionenuitwisselaar). De behandeling geschiedde op discontinue wijze, dat wil zeggen, de vloeistoffen werden met de polystyreenderivaten gemengd, waarna het mengsel na kortere of langere tijd door afzuigen over glaswol weer werd gescheiden. Van de nog vochtig aandoende kationenuitwisselaar werd per behandeling een hoeveelheid van 0,25 tot 0,45 g/ml vloeistof gebruikt. Om te voorkomen, dat de pH van de oplossing tot een te geringe waarde zou dalen werd aan de kationenuitwisselaar nog een hoeveelheid luchtdroge anionenuitwisselaar, variërend van 0,25 tot 0,90 g/ml, toegevoegd.

Het door de werking der ionenuitwisselaars ontstane neerslag, werd door centrifugering uit de filtraten verwijderd (45 min. bij circa 10.000 *g*). Het

sediment werd opgenomen in een hoeveelheid fosfaatbuffer pH 7,8 (0,033 Mol.), gelijk aan of kleiner dan het uitgangsvolume.

Zowel van de bovenstaande vloeistoffen als van de opgeloste sedimenten, werd de remstofactiviteit bepaald. Tevens werden beide typen van oplossingen aan papierelektroforese onderworpen.

3.2.2. Resultaten.

Hoewel het papierelektroforetisch onderzoek niet heeft geleid tot een opheldering van de aard van de inhibitor, kunnen er toch enkele waardevolle gegevens omtrent deze verbindingen aan worden ontleend. Zo is allereerst gebleken, dat elektroforese van anjerinhibitorhoudende oplossingen met behoud van een deel der remstofactiviteit mogelijk is, bij spanningen van 100 tot 360 V, in een pH-gebied van 5,4 tot 8,1. De remstofactiviteit, die na extractie der elektroferogrammen in de vloeistoffen kon worden aangetoond, bedroeg gemiddeld circa 10 % van de activiteit in de opgebrachte vloeistoffen. Dit verlies aan werkzaamheid zal ten dele op inactivering van de remstof berusten. Er dient echter ook rekening mee te worden gehouden, dat zeker niet alle remstof uit het papier kon worden geëlueerd. In die gevallen, waar de zones met een duidelijke remstofactiviteit in het eerste extract een tweede maal geëxtraheerd werden, bleek namelijk ook dit extract – zij het in mindere mate – remmende eigenschappen te bezitten.

Bij de opgegeven uiterste pH-waarden, vooral bij pH 8,1 , was de na elektroforese teruggevonden remstofactiviteit duidelijk minder dan bij de overige waarden, zodat deze hier het karakter van grenswaarden bezitten. Wat betreft de ionaire eigenschappen van de inhibitor, moet worden geconcludeerd, dat deze in het genoemde pH-gebied geen duidelijke netto-lading bezit. Hoewel de remstof namelijk in alle gevallen – en soms vrij aanzienlijk – in de richting van de kathode werd verplaatst, bij voorbeeld bij 360 V en pH 7,8 in 12 h 2,6 cm, bedroeg deze verplaatsing toch niet meer dan die, welke ongeladen moleculen onder dezelfde omstandigheden ten gevolge van vloeistofstroming door endosmose en verdamping ondergingen. Bij gebruik van de fosforzuurbuffers werd dit aangetoond door het gelijktijdig elektroforeren van een glucose-oplossing (zie foto 6). Uit dit gedrag mag echter nog niet worden geconcludeerd, dat de remstof in het geheel geen lading bezit, of onder andere omstandigheden zou kunnen bezitten. In de loop van het onderzoek bleek namelijk tevens, dat aminozuren, als alanine, valine en leucine, zich in het pH-gebied van 5,4 – 8,1 en bij spanningen tot 360 V eveneens als neutrale verbindingen gedragen (zie in dit verband foto 6). Als iso-elektrische punten worden voor deze aminozuren in de literatuur (Neurath & Baily, 1953, blz. 469) waarden opgegeven van respectievelijk 6,00; 5,96 en 6,02.

Het gebruik van een boorzuurbuffer, waardoor suikers worden omgezet in esters van dit zuur, die zich in het elektrisch veld verder als anion gedragen, sorteerde ten aanzien van de remstof geen effect. Glucose onder dezelfde omstandigheden geëlektroforeerd gaf wèl een aanzienlijke verplaatsing in de richting van de anode te zien.

De na elektroforese nog aantoonbare remstofactiviteit werd in alle gevallen aangetroffen in een smalle zone van 1 tot 2 cm breedte. Het volume van de extracten dezer zones was circa twee maal zo groot als dat van de opgebrachte remstofhoudende oplossingen.

Zoals eerder gezegd, waren de aan elektroforese onderworpen remstofhoudende oplossingen sterk bruin tot bruinzwart gekleurd. De gekleurde verbinding was, gezien haar gedrag in de ultracentrifuge, vrij hoogmoleculair. Zowel in de ultracentrifuge als bij precipitatie met $(NH_4)_2SO_4$ bleef zij de remstof hardnekkig vergezellen. Tijdens de elektroforese echter trad er onmiddellijk een scheiding op. De gekleurde verbinding verplaatste zich bij gebruik van de verschillende fosfaatbuffers snel naar de anode. Bij een spanning van 360 V en een pH van 7,8 liep zij in $9\frac{1}{2}$ h zelfs voor een deel van het papier af. De extracten der zones aan de kathode-helft der elektroferogrammen, met name de remstofhoudende, waren dan ook volkomen kleurloos.

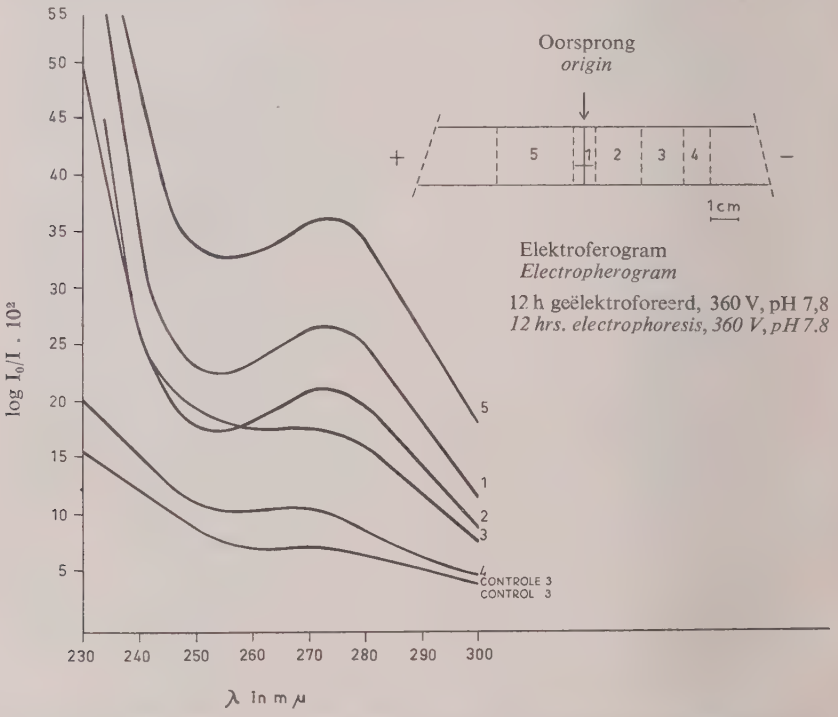


FIG. 4. Absorptiespectra van de onverdunde extracten der aangegeven zones uit elektroferogrammen van de remstofhoudende oplossing xy_1Z_3 (zie schema 2).
De remmende werking der onverdunde extracten werd bepaald ten aanzien van T.M.V. (33 γ virus/ml) op *Nicotiana glutinosa* (vijf bladeren per serie). De activiteitspercentages bedroegen: bij toetsing van het extract van,
zone 1: 71% zone 4: 50%
zone 2: 100% zone 5: 100%
zone 3: 0,6%

Fig. 4. Ultraviolet spectra from undiluted solutions obtained by extracting the indicated parts of electropherograms, of the inhibitor-containing solution xy_1Z_3 (see scheme 2).
Virus-inhibiting properties have been determined against T.M.V. (33 γ virus/ml) and Nicotiana glutinosa (5 leaves per series). Activity percentages of the mixtures containing equal volumes of virus-solution and the extract concerned were:
zone 1: 71% zone 4: 50%
zone 2: 100% zone 5: 100%
zone 3: 0.6%

Een nadere karakterisering van de remstof aan de hand van absorptie-eigenschappen in ultraviolet licht was niet mogelijk, daar de inhibitor in de extracten geen absorptie-maximum vertoonde. In fig. 4 zijn de resultaten van zo'n spectrofotometrisch onderzoek weergegeven. Behalve het extract van de zone met maximale remstofactiviteit, werden ook de extracten der naburige zones doorgemeten. Ook werd het extract van blanco zones 3 onderzocht. Hiertoe werden stroken, waarop in plaats van remstofhoudende oplossingen H_2O was opgebracht, onder dezelfde omstandigheden geëlektroforeerd en geëxtraheerd.

In de gedroogde stroken vertoonden de zones corresponderend met de duidelijk remstofhoudende delen der natte elektroferogrammen, bij gebruik van beide typen van bufferoplossing, steeds een sterke fluorescentie in ultraviolet licht. Deze zones kleurden tevens intensief met ninhydrine. Een duidelijke binding van broomfenolblauw werd daarentegen nooit gevonden. De intensiteit der aniline-fosfaatkleuring was verschillend, afhankelijk van de gebezigde remstofoplossing. Na elektroforese van oplossing $A_{2\cdot2}$ kleurde de inhibitorhoudende zone zeer sterk; gebruik van de oplossingen xy_1Z_2 en $-Z_3$ leverde echter slechts een zeer zwakke kleuring op (steeds bij gebruik van fosfaatbuffers).

Eveneens afhankelijk van de geëlektroforeerde oplossing, kleurden ook andere delen der elektroferogrammen met ninhydrine of anilinefosfaat en/of vertoonden fluorescentie. Als voorbeeld is een elektroferogram afgebeeld, verkregen door elektroforese van oplossing $A_{2\cdot2}$ (foto 6). Een overlangse helft is met ninhydrine, de andere met het suikerreagens gekleurd. Tevens zijn de gekleurde helften van twee andere elektroferogrammen afgebeeld, waarop respectievelijk glucose en een aminozuurmengsel was opgebracht.

Afgaande op de fluorescentie en de ninhydrinekleuring van de remstofhoudende zones der elektroferogrammen, scheen het geoorloofd de inhibitor als een proteïne te beschouwen. De kleuring met anilinefosfaat, bij gebruik van fosforzuurbuffers, suggereerde bovendien, dat de remstof ook nog een suikercomponent bevatte (glycoproteïne?). Toepassing van de boorzuurbuffer toonde echter aan, dat de suikercomponent naar alle waarschijnlijkheid geen wezenlijk onderdeel van de remstof uitmaakte. Dit werd nog bevestigd door het papierchromatografische onderzoek. In de elektroferogrammen met fosforzuurbuffers bleken de zones met remstofwerking nl. enkel vrije monosen te bevatten. Papierchromatografie (een- en tweedimensionaal) van niet en wel gehydrolyseerde gedeelten der extracten van genoemde zones toonden bovendien aan, dat deze ook ten aanzien van de met ninhydrine reagerende verbindingen samengesteld van aard waren. Zo bleek de sterke ninhydrine-kleuring der zones met inhibitor-activiteit voornamelijk een gevolg te zijn van de aanwezigheid van een aantal vrije aminozuren, te weten, de „neutrale" aminozuren: leucine, valine, alanine, glycine (weinig), threonine (spoor) en serine (spoor). Voor de remstofhoudende oplossingen $a_{1\cdot1}$, xy_1Z_2 en xy_1Z_3, was het optreden van vrije aminozuren in de extracten zeer verrassend, gezien de manier waarop deze aan elektroforese onderworpen oplossingen waren verkregen (zie schema 1 en 2). Het onder de toegepaste omstandigheden indifferente gedrag van genoemde aminozuren werd bevestigd door elektroforese van een mengsel der synthetische verbindingen, waaraan bovendien nog glutaminezuur en asparaginezuur waren toegevoegd (zie in dit verband foto 6).

Bij papierchromatografisch onderzoek van de gehydrolyseerde extracten bleken de inhibitorhoudende zones, na elektroforese van de oplossingen $A_{2\cdot2}$ en

xy_1Z_3, ook nog een verbinding (of verbindingen) met polypeptide karakter te bevatten. Buiten de reeds eerder genoemde aminozuren, waarvan serine, glycine en alanine sterk in gehalte waren toegenomen, tegen valine en leucine matig tot weinig, bevatten de chromatogrammen der gehydrolyseerde extracten namelijk nieuwe verbindingen, te weten: glutaminezuur, asparaginezuur en vermoedelijk een basisch aminozuur in sporen. Wat de beide 2-basische zuren betreft, zou men nog kunnen denken, dat zij bij de hydrolyse uit hun respectieve amiden zouden zijn gevormd. Dit is zeker voor asparaginezuur hier niet mogelijk, daar asparagine, gezien zijn opvallend bruine kleurreactie met ninhydrine, in de chromatogrammen der niet-gehydrolyseerde extracten zou hebben moeten opvallen.

Van de elektroferogrammen, die bij de in figuur 4 aangeduide proef werden verkregen, werden behalve de extracten der zones 3 ook die der aangrenzende zones 4, 2 en 5 gehydrolyseerd en gechromatografeerd. Het chromatogram van het hydrolysaat van 4 gaf slechts asparaginezuur (?) en glycine, beide in uiterst kleine hoeveelheid, te zien. De chromatogrammen (één- en twee-dimensionaal) der andere gehydrolyseerde extracten, waren kwalitatief gelijk aan die van zone 3. De kwantitatieve verschillen waren niet zodanig, dat hieruit, hetzij een duidelijk verschil in het gehalte van de eiwitachtige verbinding in de zones 2, 3 en 5 bleek, hetzij tot een verschillende geaardheid van deze component in de aangrenzende zones mocht worden besloten. In hoeverre in deze extracten nog mengsels van eiwitachtige verbindingen voorkwamen kon papierchromatografisch niet worden uitgemaakt. In de chromatogrammen der niet gehydrolyseerde extracten kwam namelijk, behoudens een uiterst vaag, nogal diffuus vlekje met een R_F (fenol) tussen die van alanine en valine, geen met ninhydrine kleurende vlek voor, die niet aan een aminozuur moest worden toegekend. Er zij in dit verband nog op gewezen, dat het, gezien de aanwezigheid van bufferzouten, niet mogelijk was al te grote volumina der extracten op de chromatogrammen op te brengen en, dat sommige eiwitachtige verbindingen slechts zwak of in het geheel niet met ninhydrine reageren.

Indien de bij hydrolyse vrij gekomen aminozuren van de extracten 3, 2 en 5 inderdaad afkomstig zouden zijn van een enkele eiwitverbinding, dan is het – gelet op de remstofactiviteit van genoemde vloeistoffen – onwaarschijnlijk, dat deze verbinding iets met de inhibitorwerking heeft te maken.

Het papierchromatografisch onderzoek naar de suikers in de extractievloeistoffen der zones 2, 3, 4 en 5 leverde het volgende resultaat op. Van de gehydrolyseerde vloeistoffen bleek slechts die, afkomstig van zone 3 suikers te bevatten en wel glucose (weinig), arabinose en een suiker(spoor), die in fenol sneller loopt dan arabinose. Dit drietal bleek als zodanig echter ook reeds aanwezig in de betreffende extractievloeistof, vóór de hydrolyse. In de gehydrolyseerde extractievloeistoffen der blanco elektroferogrammen konden noch suikers, noch aminozuren worden aangetoond.

Het gebruik van synthetische ionenuitwisselaars had aanvankelijk alleen de verwijdering der vrije aminozuren uit de remstof houdende oplossingen ten doel, alvorens deze aan papierelektroforese te onderwerpen. De inwerking bleek echter andere belangrijke gevolgen te hebben. Toevoeging van mengsels IR-120 H en IRA-400 OH, die een daling van de pH tot circa 4,5 of lager veroorzaakten, deden namelijk in de oplossingen $A_{2\cdot2}$, xy_1Z_2 en xy_1Z_3 onmiddellijk een vlokkig neerslag ontstaan. Gebruik van een mengsel, dat meer anionenuitwisselaar bevatte,

veroorzaakte ook bij een pH van 5,5 reeds een neerslag, mits maar voldoende van het kunstharsmengsel werd gebruikt. Na centrifugering loste het bruine aardachtige neerslag gemakkelijk in fosfaatbuffer pH 7,8 op. Het volume kon zonder moeite worden teruggebracht tot een derde van het uitgangsvolume. De verkregen oplossingen waren volkomen helder en bruinzwart van kleur. De na centrifugering afgeschonken bovenstaande vloeistoffen waren eveneens volkomen helder. Hun kleur was geel. Bij toetsing tegen T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* (vijf bladeren per serie), op de gebruikelijke wijze, bleek zowel in de bovenstaande vloeistoffen als in de opgeloste neerslagen inhibitor voor te komen. Laatstgenoemde oplossingen hadden verreweg de hoogste activiteit. Zo werden bij voorbeeld met twee porties van oplossing $A_{2\cdot2}$, die op de hieronder aan te geven wijzen behandeld waren, de volgende resultaten verkregen:

Activiteitspercentages van de T.M.V.-vloeistof-mengsels

Verdunning der vloeistoffen	Onverdund	Verdund 10^{-1}
oorspronkelijke vloeistof $A_{2\cdot2}$	0,0	5,7
bovenstaande vloeistof 1	16,1	71,1
opgelost neerslag 1	0,0	0,4
bovenstaande vloeistof 2	12,2	62,9
opgelost neerslag 2	0,0	1,2

De verschillende vloeistoffen waren als volgt verkregen: 3 ml $A_{2\cdot2}$ + respectievelijk 1,5 en 2,1 gram kunstharsmengsel (verhouding kationen/anionenuitwisselaar, respectievelijk 1:1 in proef 1 en 1:2 in proef 2), werden na respectievelijk 3 en 5 h staan, afgezogen en gecentrifugeerd. De pH der bovenstaande vloeistoffen bedroeg 4, respectievelijk 4,3. De sedimenten werden in beide gevallen in 1 ml buffer opgenomen.

Op grond van de hierboven weergegeven resultaten en andere soortgelijke waarnemingen, zou men geneigd zijn aan de remstof het karakter van een anion toe te kennen. Gelet op de reeds beschreven resultaten van het papierelektroforetisch onderzoek moet men echter besluiten, dat de precipitatie van de inhibitor niet primair een gevolg kan zijn van de verlaging van de pH van het vloeistofmilieu. Men moet eerder een wisselwerking aannemen tussen de „neutrale" remstof en een component met anion-karakter. Hiervoor zou blijkens het gedrag in het elektrisch veld, de bruingekleurde verbinding in aannmerking kunnen komen. Gemakshalve wordt hier van verbinding gesproken; het kunnen eventueel ook meer verbindingen zijn.

Bij papierelektroforese van de oplossingen der neerslagen bewogen de gekleurde component en de remstof zich weer in tegengestelde richting, respectievelijk naar de anode en de kathode. De remstof werd weer aangetroffen in het gebied, waar hij ook bij vroegere proeven kon worden aangetoond. Ook in het geval, waarbij de na behandeling met ionenuitwisselaars en centrifugeren verkregen bovenstaande vloeistof papierelektroforetisch werd onderzocht, was zulks het geval.

Ten behoeve van het papierchromatografisch onderzoek werd, na elektroforese van een opgelost neerslag verkregen door behandeling van $A_{2\cdot2}$, de zone met de gekleurde component geëxtraheerd. In de chromatogrammen van de gehy-

drolyseerde extractievloeistof, werden zowel aminozuren als suikers gevonden. Daar deze als zodanig niet in het niet-gehydrolyseerde extract voorkwamen, zou de gekleurde component mogelijk een glycoproteïne kunnen zijn. Tot slot zij nog vermeld, dat bij de proeven van een belangrijke binding van de remstof met de ionenuitwisselaars niets is gebleken.

4. CONCLUSIES

Bij de isolering van de inhibitor uit anjer op preparatieve schaal, uitgaande van bij laag toerental helder gecentrifugeerd sap, heeft toepassing van de ultracentrifuge vooral betekenis voor de afscheiding van begeleidende verbindingen met een hoger moleculair gewicht dan de remstof. Bij 16 h centrifugeren bij circa 130.000 *g* wordt immers maar rond 10 % van de in de uitgangsvloeistof aanwezige inhibitor neergeslagen, terwijl daarenboven in de sedimenten andere verbindingen worden opgehoopt (zie tabel 16 bij a_1, $a_{1\cdot1}$ en B_3 en vergelijk in foto 5 serie a en b). Daarnaast kan de remstof door langdurige ultracentrifugering (16 h) in aanzienlijke mate in de diepere lagen van de bovenstaande vloeistof worden opgehoopt.

Verzadiging van anjersap en waterige remstofhoudende oplossingen (xy_1) met $(NH_4)_2SO_4$ tot 50 %, doet de remstof gemakkelijk neerslaan. Opnemen van het precipitaat in een volume H_2O kleiner dan het uitgangsvolume sap heeft geen absolute concentrering van de remstof ten gevolge, indien althans de verkregen suspensie bij laag toerental wordt gecentrifugeerd (oplossing xY_1). Daarentegen wordt bij de gevolgde werkwijze wel een der begeleidende bestanddelen uit het anjersap aanmerkelijk geconcentreerd (vergelijk in foto 5 serie c met a en b).

Er komt in sap van ten dele verhoute anjerspruiten een bruin gekleurde verbinding voor, die zich in een centrifugaalveld op overeenkomstige wijze gedraagt als de remstof (IV.3.1.). Deze verbinding wordt ook door $(NH_4)_2SO_4$ geprecipiteerd en is verantwoordelijk voor het optreden van een piek in de sedimentatie-diagrammen van onder andere de oplossingen xy_1Z_2 en xy_1Z_3 (foto 5, serie c). Bij vergelijking van de uit de diagrammen te berekenen sedimentatieconstante van de gekleurde verbinding en de door biologische toetsing bepaalde sedimentatieconstante van de remstof, blijkt de orde van grootte van deze laatste juist te zijn (tabel 16).

Papierelektroforese van remstofhoudende oplossingen is mogelijk met behoud van een deel der biologische activiteit, bij spanningen van 100 tot 360 V en in een pH-gebied van 5,4 tot 8,1. De remstof gedraagt zich bij deze pH-waarden als een neutrale verbinding. De onder genoemde omstandigheden van pH en elektrische spanning optredende verplaatsing in de richting van de kathode, is het gevolg van vloeistofstroming door endosmose en verdamping (foto 6). De in de remstofhoudende oplossingen voorkomende bruin gekleurde verbinding heeft duidelijk het karakter van een anion, en verplaatst zich dienovereenkomstig naar de anode.

Kleurloze, water-heldere extracten van de remstofhoudende delen der elektroferogrammen bleken bij papierchromatografische analyse samengesteld van aard te zijn en naast suikers en vrije aminozuren ook een eiwitachtige verbinding te bevatten. Deze laatste mag echter, gezien het voorkomen van een dergelijke stof in aangrenzende delen van het elektroferogram zonder remstofactiviteit, niet zonder meer als drager van de inhibitor-eigenschappen worden aan-

geduid. Daar aanwending van een boorzuurbuffer de looprichting van de remstof in een elektrisch veld niet beïnvloedt, kan deze naar alle waarschijnlijkheid geen suikercomponent als wezenlijk bestanddeel bevatten. De remstof bezit geen absorptie-maximum in het ultraviolet (figuur 4). De remstof vertoont een zekere affiniteit tot de „hoogmoleculaire" bruin gekleurde component uit anjersap. Onder omstandigheden, waarbij deze vanwege zijn anionkarakter wordt neergeslagen, wordt ook de remstof in belangrijke mate uit de oplossing verwijderd.

Samenvattend kan er met betrekking tot de isolering van de remstof op preparatieve schaal worden gezegd, dat het aanbeveling verdient de door $(NH_4)_2SO_4$-precipitatie en/of ultracentrifugering verkregen remstofoplossingen ter verdere fractionering aan elektroforese te onderwerpen. Ten aanzien van de eigenschappen van de remstof zij gewezen op het neutrale karakter in het pH-gebied van 5,4 tot 8,1, het moleculairgewicht in de orde van 10.000 en het ontbreken van een absorptie-maximum in ultraviolet licht.

Wat tenslotte de aard van de remstof betreft, moet worden opgemerkt, dat het eiwitachtige karakter hiervan niet met zekerheid kon worden aangetoond, hoewel onder andere de inactivering door verhitting wel in die richting wijst.

HOOFDSTUK V

KRITISCHE BESPREKING VAN LITERATUUR BETREFFENDE DE VIRUSREMMING DOOR IN DE NATUUR VOORKOMENDE REMSTOFFEN

1. INLEIDING

De onderzoekingen, die in de vorige hoofdstukken werden besproken, hadden op de eerste plaats ten doel, het mechanisme der virusremming, veroorzaakt door de inhibitor uit anjer, op te helderen. Daarnaast werd echter beoogd om, zoals in I.3. werd aangegeven, aan de hand van de resultaten en inzichten met deze bepaalde remstof verkregen, een bijdrage te leveren tot de kennis der virusinhibitie bij hogere planten in het algemeen. Met virusinhibitie wordt hier bedoeld het achterwege blijven, of verminderd optreden, van ziektesymptomen na inoculatie van planten met virushoudende oplossingen, ten gevolge van de werking van een remstof. In dit hoofdstuk zal daarom uit literatuurgegevens een overzicht worden gegeven van de stand van het onderzoek op genoemd terrein.

Voor een interpretatie van het mechanisme der virusremming is het van belang zoveel mogelijk aard en eigenschappen der verbindingen te kennen, die de remming teweeg brengen. Wij zullen dan ook allereerst aandacht besteden aan de remstoffen zelf. Hierbij zullen wij slechts die inhibitoren in beschouwing nemen, die tenminste enigermate gekarakteriseerd zijn. Verder zullen wij ons beperken tot in de natuur voorkomende remstoffen, met uitsluiting van die van dierlijke oorsprong. Aan perssappen van tal van hogere planten moeten blijkens opgaven in de literatuur in mindere of meerdere mate virusremmende eigenschappen worden toegekend. Een uitvoerig overzicht wordt gegeven door BARTELS (1955, blz. 164–170). Sommige van deze sappen danken hun remmende werking kennelijk aan het voorkomen van looistoffen in de betreffende planten, o.a. aardbei (BAWDEN & KLECZKOWSKI, 1945) en dahlia (CORNUET, 1950). Looistoffen zijn per definitie verbindingen, die huideiwitten zodanig denatureren, dat zij in leer worden omgezet. Met opgeloste eiwitten treden zij in reactie onder vorming van onoplosbare verbindingen. Daar aan dergelijke verbindingen geen specificiteit ten aanzien van hun werking op virussen kan worden toegekend, zullen wij deze categorie van stoffen ook niet verder vervolgen. Na de bespreking der remstoffen zullen wij nagaan, waar volgens de verschillende auteurs de aangrijpingspunten der diverse verbindingen liggen en welke opvattingen zij verder over het remmingsmechanisme hebben. Het zal duidelijk zijn, dat hierbij het probleem der virusinfectie en -vermeerdering ter discussie zal komen. Wij zullen de verschillende meningen onderling vergelijken en kritisch benaderen. Ter toelichting en om een persoonlijk oordeel te ondersteunen zal hierbij, voorzover dienstig, in het voorgaande nog niet ter sprake gekomen literatuur worden aangehaald.

2. AARD EN EIGENSCHAPPEN VAN ENIGE IN DE NATUUR VOORKOMENDE VIRUSREMSTOFFEN

Bij uitsluiting van die verbindingen, die op grond van in het voorgaande gemaakte beperkingen niet voor bespreking in aanmerking komen, zijn de hieronder te vermelden stoffen gekozen, omdat zij tot op heden het meest volledig zijn gekarakteriseerd. Voor zover mogelijk zal een overzicht worden gegeven van de wijze, waarop zij werden geïsoleerd, van hun chemische en fysische eigenschappen, van hun werkingsspectrum en werkzame concentratie. De te bespreken biologisch-actieve stoffen zijn:

remstoffen uit *Spinacea oleracea*,
remstof uit *Phytolacca esculenta*,
remstof uit *Dianthus barbatus*,
remstof uit *Tetragonia expansa*,
remstoffen uit cultuurvloeistoffen van de schimmels *Trichotheceum roseum* en *Neurospora* spec.
remstof uit bakkersgist.

Remstoffen uit *Spinacea oleracea* (Kuntz & Walker, 1947).

Kuntz & Walker werkten met helder gecentrifugeerd sap, of sap, dat na uitpersen van fijngemaakt bevroren plantemateriaal over een mengsel van asbest en celite (= geprepareerde infusoriënaarde) was gefiltreerd. In beide gevallen spreken zij van spinazie-extract. De samengesteldheid van het remmende principe trad aan het licht in proeven, waarbij dit „extract" met het adsorbens Nuchar W (= geactiveerde kool) werd behandeld (10 g adsorbens/100 ml extract). Hierbij ging het remmende vermogen tegen T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* verloren, terwijl dat tegen koolmozaiekvirus op White Burley tabak volledig gehandhaafd bleef. Gebruik van celite in dezelfde concentratie had nagenoeg geen effect. De remstof tegen T.M.V. werd bij verhitting op 65°C gedurende 12 min. vernietigd. Hij bleek niet dialyseerbaar (vier dagen in Visking-slang, zowel tegen stromend water als tegen porties gedestilleerd water) en werd neergeslagen (lees: geïnactiveerd) door toevoeging van ethanol tot 50%. Deze karakteristiek suggereert volgens de auteurs, dat de verbinding niet kristallijn van aard is, een betrekkelijk hoog moleculair gewicht bezit en in sommige opzichten op eiwitten gelijkt. In het extract werd zij bij een pH tussen 3 en 9,5 gedurende 24 h niet geïnactiveerd. De auteurs laten hierbij in het midden of het om een enkelvoudige stof, dan wel om een mengsel gaat.

De verbinding met werkzaamheid tegen koolmozaiekvirus vertoonde de volgende eigenschappen. Zij bleek dialyseerbaar (ook in cellofaanslang), werd niet vernietigd bij verhitting op 125°C gedurende 15 min. en werd niet bij de eerder genoemde alcoholconcentratie neergeslagen. Bij toevoeging van $CaCl_2$ aan het extract, waaruit de niet dialyseerbare remstof was verwijderd (bv. door verhitting) ontstond een neerslag. Het filtraat bezat geen remming meer tegen koolmozaiekvirus. De auteurs veronderstellen daarom een of meer kristallijne verbindingen.

Spinazie-extract bleek behalve tegen T.M.V. (op *Nicotiana glutinosa*) en koolmozaiekvirus (op *Nicotiana tabacum*) ook werkzaam tegen ringspot-virus van tabak, twee stammen van aardappel-X-virus (alle getoetst op *Nicotiana tabacum*) en komkommermozaiekvirus (op *Amaranthus caudatus*).

Bij toetsing tegen T.M.V., in sap van met dit virus besmette tabaksbladeren, bleek de remstof tot een verdunning van 10^{-3} nog werkzaam (gelijke volumina van beide werden gemengd).

Remstof uit *Phytolacca esculenta* (Kassanis & Kleczkowski, 1948).

De isolering en zuivering van de remstof werd als volgt uitgevoerd. Aan 1 l sap werd 500 ml ethanol toegevoegd en het neerslag door centrifugering verwijderd. Aan de heldere bovenstaande vloeistof werd 1500 ml ethanol (96%) toegevoegd en het neerslag weer afgecentrifugeerd. Dit werd opgenomen in 250 ml 2% NaCl en het onopgeloste materiaal door centrifugering verwijderd. De heldere grijsgekleurde bovenstaande vloeistof werd in cellofaanhuls gedurende twee dagen tegen gedestilleerd water gedialyseerd. Na afloop werd de gedialyseerde vloeistof geneutraliseerd en gecentrifugeerd.

Aan 100 ml van deze vloeistof werd 2 g celite toegevoegd en onder af en toe schudden gedurende 1 h bij kamertemperatuur geplaatst. Hierna werd afgezogen, het op het filter achtergebleven celite met 200 ml H_2O gewassen en vervolgens in 30 ml 10% NaCl-oplossing gesuspendeerd. Na 4 h staan bij kamertemperatuur werd afgezogen en het filtraat 24 h tegen vaak ververst gedestilleerd water gedialyseerd. Opbrengst 20–60 mg/l.

Daar een oplossing van 2 mg gezuiverde remstof/l een even sterke werking bezat als 10^{-2} verdund uitgangssap, concludeerden genoemde auteurs, dat dit laatste dus 200 mg/l aan werkzame stof bevatte en dat het verlies tijdens de zuivering 60–90% bedroeg. Indien hetzelfde procédé werd toegepast op tabakssap, werd bij de elutie van het celite met 10% NaCl-oplossing niets verkregen.

Het gezuiverde inhibitor-preparaat bezat een N-gehalte van 14–15%, en een koolhydraatgehalte van 8–12% (colorimetrisch bepaald volgens de orcinol-H_2SO_4-methode). Er werd geen P in gevonden. De zuivere remstof kon uit de oplossing worden neergeslagen met 5% trichloorazijnzuur en door toevoeging van 95% verzadigde $(NH_4)_2SO_4$-oplossing. De remstof vertoonde een positieve biuret-reactie. Op grond van deze eigenschappen werd aangenomen, dat de werkzame verbinding een eiwitverbinding was. Daar bovendien de koolhydraatcomponent bij het neerslaan met $(NH_4)_2SO_4$ of trichloorazijnzuur voor het grootste gedeelte niet van het eiwit werd gescheiden, werd deze als een wezenlijk bestanddeel van de remstof opgevat. De auteurs willen daarom de remstof voorlopig als glycoproteïne betitelen, hoewel zij uitdrukkelijk vermelden, dat zij de homogeniteit van het verkregen preparaat niet met daartoe geëigende methoden hebben getoetst. In sap ging bij 10 min. verhitten op 100°C de werkzaamheid geheel verloren.

De eiwitachtige verbinding bleek in de niet biologisch-actieve vorm een iso-elektrisch punt rond 7 (bepaald met behulp van een glaselektrode) te bezitten. Volgens de auteurs is de remstof behalve tegen T.M.V. ook werkzaam tegen bushy stunt virus, aardappel-X-virus, komkommermozaiekvirus en een tabaksnecrosevirus. Behalve van T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* werden echter geen proefresultaten vermeld.

Een mengsel van gelijke volumina remstofoplossing en T.M.V.-oplossing, respectievelijk 2 γ en 150 γ/ml bevattend, gaf bij toetsing op *Nicotiana glutinosa* gemiddeld 4 lokale vlekken tegen 47 bij de controle.

Indien T.M.V. en het glycoproteïne in zoutvrije oplossingen in een gewichtsverhouding tussen 1:1 en 1:2 en in een pH-gebied tussen 4,2 en 7 werden gemengd, ontstond een neerslag. Dit was zeer duidelijk, indien de oplossingen elk 100 γ stof/ml bevatten. Bij mengsels van remstof en virus, waarbij geen neerslag ontstond noch opalescentie optrad, kon door ultracentrifugering een binding tussen beide worden aangetoond. Nagenoeg alle remstof (glycoproteïne) werd in 1 h bij 40.000 t./min. uit een oplossing geslingerd, die 0,1% glycoproteïne en 0,3% T.M.V. bevatte. Indien er geen virus aanwezig was, bleef de remstof onder dezelfde omstandigheden in oplossing.

Remstof uit *Dianthus barbatus* (Weintraub & Gilpatrick, 1952).

De auteurs werkten uitsluitend met ruw plantesap, afkomstig van duizendschoonbladeren van kloon Db 20. De opzet der proeven was in het algemeen zodanig, dat slechts conclusies van kwalitatieve aard konden worden getrokken.

De remstof-activiteit ging bij verhitting gedurende 15 min. op 80°C verloren, bij verhitting op 60° en 70° werd echter ook reeds een verminderde werking geconstateerd. Dialyse in stromend water gedurende 6 h deed de remstofwerking niet verloren gaan. Verlaging van de pH van het sap tot 3 (fosfaat-citraatbuffer) had in 30 min. verlies van inhibitor-activiteit tot gevolg. Daarentegen hadden pH-waarden tussen 4 en 11,8 geen invloed. Door centrifugering gedurende 30 min. bij 12.000 t./min. werd een deel van de remstof neergeslagen.

Toetsing van sap, afkomstig van met ringspot-virus besmette duizendschoonplanten, behorend tot verschillende klonen, op tabak leverde wisselende resultaten op, hetgeen de auteurs deed vermoeden, dat het remstofgehalte in de diverse klonen verschillend was. De remstof bleek ook werkzaam tegen tabaks-ringspot-virus bij toetsing op *Cucumis sativus* en *Anthirrinum majus* (gelijke volumina virus en remstofhoudend sap werden gemengd). Ook T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* en komkommermozaiekvirus en tobacco etch virus, beide op *Nicotiana tabacum*, werden geremd.

Een gedeeltelijk gezuiverd T.M.V.-preparaat, gemengd met een gelijk volume sap van kloon Db 20, leverde bij toetsing op *Nicotiana glutinosa* gemiddeld 10 vlekken per bladhelft tegen 93 op de controlehelft.

Remstof uit *Tetragonia expansa* (Benda, 1956).

Behalve van ruw sap maakte de auteur ook gebruik van een gedeeltelijk gezuiverd remstofpreparaat uit het sap van deze tot de posteleinachtigen behorende planten. Bij de zuivering werd sap van bevroren planten gebruikt. Het merendeel van het water werd verwijderd door verdamping bij kamertemperatuur gedurende twee dagen. Laagmoleculaire verbindingen werden door dialyse tegen gedestilleerd water gedurende vier dagen bij 4 C verwijderd. Veel van het grovere materiaal werd afgescheiden door hierop volgende centrifugering bij laag toerental en verder door centrifugering na respectievelijk verhitten op 60 C gedurende 10 min., en na bevriezen en opdooien. Tenslotte werd de heldere bovenstaande vloeistof met behulp van de vriesdroogtechniek geheel ingedampt. Het achtergebleven materiaal met remstofwerking loste gemakkelijk in gedestilleerd water op.

In ruw sap bleek de remstof bij verhitting op 80°C gedurende 10 min. onwerkzaam te worden. Bij dialyse in Visking-slang, zelfs gedurende 10 dagen, ging hij niet verloren. Ook werd de inhibitor niet neergeslagen tijdens een centrifugering in een Spinco Ultracentrifuge bij 105.000 *g* gedurende 2 h.

De opgesomde eigenschappen, in het bijzonder de thermolabiliteit en het niet diffunderen door dialyse-slang suggereren, volgens de auteur, dat de remstof een betrekkelijk stabiel eiwit is. De gedeeltelijk gezuiverde remstof gaf, indien vers bereid, in een hoeveelheid van 1,25 mg/ml een duidelijke remming van tabaks-ringspot-virus bij toetsing op *Vigna sinensis* en *Nicotiana tabacum*.

Behalve een virusremstof bleek in het sap een verbinding voor te komen, die de virusinfectie bevorderde. Op indirecte wijze, nl. door gebruik van Na-oxalaat, kon worden aangetoond dat de betreffende stof een oplosbaar oxalaat was. Dit vermoeden lag enigszins voor de hand aangezien *Tetragonia expansa* in zijn droge stof 5–10% oxaalzuur bevat.

Remstoffen geproduceerd door *Trichotheceum roseum* (Bawden & Freeman, 1952).

Er bleken in de cultuurvloeistof van *Trichotheceum roseum* Link twee typen van remstoffen voor te komen met sterk verschillende moleculairgewichten. De laagmoleculaire verbinding ($C_{19}H_{21}O_3$) werd geïdentificeerd als een ester van isocrotonzuur en trichothecolon, een ketonalcohol (Freeman & Gill, 1950). De hieronder aangegeven cultuurvloeistof bevatte 42 mg/l trichothecine. De hoogmoleculaire remstof (een polysaccharide) werd als volgt verkregen en gezuiverd. De schimmel werd gedurende 28 dagen gekweekt in een medium, dat 40 g glucose/l en 1% (v/v) maïsextract bevatte. De gefiltreerde cultuurvloeistof (7 l) werd door vacuümdestillatie ingedampt tot 500 ml. Dit volume werd een dag aflopend gedialyseerd tegen leidingwater en een dag tegen gedestilleerd water. De binnenvloeistof werd hierna door vacuümdestillatie verder geconcentreerd tot 100 ml. Het droge-stofgehalte bedroeg 42,4 g/l (hierin na hydrolyse ca. 60% reducerende suikers, als glucose bepaald). De vloeistof werd tweemaal geschud met chloroform ter verwijdering van eiwitsubstantie (Sevag et al, 1938). De chloroformphase bleek bij extractie met 50 ml H_2O een spoor van een „eiwit" te bevatten. Een 1:5-verdunning van dit extract, gemengd met een gelijk volume T.M.V.-oplossing (5 γ virus/ml), gaf op *Nicotiana glutinosa* 10 vlekken per blad, de controle-vloeistof 97. Volgens de auteurs is dit remmend vermogen een gevolg van in de chloroform-eiwit-gel ingesloten remstof met polysaccharide-karakter. Aan de met chloroform uitgetrokken vloeistof werd vervolgens alcohol toegevoegd tot 80% (gew. gew.), in aanwezigheid van een weinig ijsazijn. In drie experimenten werd zo gemiddeld 0,41 g neerslag per liter cultuurvloeistof verkregen. Het ruwe polysaccharide werd vijf maal in H_2O opgenomen en weer met alcohol neergeslagen en vervolgens ontkleurd met kool. Indien aan de waterige polysaccharide-houdende oplossingen stijgende hoeveelheden alcohol werden toegevoegd tot een gehalte variërend van 50–80% (gew. gew.), werden neerslagen verkregen met wisselende N- en reducerende suiker-gehalten. Ook het remmend vermogen varieerde.

De fracties verkregen bij een alcoholgehalte tussen 60–75% hadden de volgende eigenschappen. Het waren nagenoeg kleurloze poeders, die gemakkelijk in H_2O oplosten. De specifieke draaiing, (α) 19 *d* was -33°. Papierchromatografisch werd in de hydrolysaten slechts galactose en een vrij zwakke vlek met R_F 0,098 aangetoond (n-butanol, ethanol, water en ammonia 45:5:49 (v/v) en 1% (gew/v) respectievelijk). De aanwezigheid van galactose werd nog op andere wijze bevestigd, nl. via de smeltpunten van de vrije suikers, zijn methylfenylhydrazon en zijn oxydatieprodukt (slijmzuur). Er werd geen uronzuur aangetoond. Het N-gehalte variëerde van 1,1–1,5%, het reducerende suikergehalte (berekend als glucose) van 60–70%.

Het D-galactose gehalte was 45%. De hoogmoleculaire verbinding bleek hittebestendig. Naar de mening der auteurs gaan remstof en virus in vitro geen binding aan. Bij centrifugering van een oplossing, die 1 mg/ml virus en eenzelfde hoeveelheid remstof bevatte, gedurende 1 h bij 40.000 t./min. kon chemisch geen remstof in het neerslag worden aangetoond (koolhydraat- en N-bepaling). De bovenstaande vloeistof had hetzelfde koolhydraatgehalte als de uitgangsvloeistof. De virusactiviteit in het neerslag werd niet bepaald.

Trichothecine werd getoetst tegen T.M.V., bushy stunt virus en een tabaksnecrosevirus; beide eerstgenoemde virussen op *Nicotiana glutinosa*, het laatstgenoemde op *Phaseolus vulgaris*. Met oplossingen, die 2,5 γ virus/ml en al of niet 100 γ trichothecine/ml bevatten, werden voor T.M.V. 70 tegen 132 vlekken, voor bushy stunt virus 40 tegen 50 en voor tabaksnecrosevirus 20 tegen 69 vlekken per blad verkregen. Bij 50 γ/ml of meer veroorzaakte trichothecine op boon vaak duidelijk beschadiging. Op *Nicotiana glutinosa* daarentegen zelden, zelfs bij 200 γ/ml. Indien trichothecine tot een dag na de inoculatie aan het blad werd toegevoegd (gesproeid), was het aantal vlekken aanzienlijk lager dan bij het onbehandelde blad, bijvoorbeeld op boon geïnoculeerd met tabaksnecrosevirus 82 tegen 300 vlekken. Een besproeiïng een dag voor de inoculatie had iets minder effect, nl. 118 tegen 300 vlekken.

Een oplossing, die 2,5 γ T.M.V./ml bevatte en al of niet 500 γ/ml van het polysaccharide (bij 75% alcoholgehalte geprecipiteerd), gaf op *Nicotiana glutinosa* 0,6 tegen 97 vlekken per blad. Deze remstof bleek ook werkzaam tegen tabaksnecrosevirus en bushy stunt virus op respectievelijk boon en *Nicotiana glutinosa*. Ten aanzien van *Nicotiana glutinosa* was de remming sterker dan op boon, bijvoorbeeld bij een tabaksnecrosevirus-preparaat van 2,5 γ/ml werden op eerstgenoemde plant 2 tegen 155 en op boon 20 tegen 78 vlekken per blad verkregen. De remstof met polysaccharide-karakter vertoonde bij gescheiden toediening alleen bij gebruik vooraf een effect. Bij tabaksnecrosevirus op boon werden, indien 1 h voor de inoculatie toegediend, 120 tegen 245 vlekken verkregen.

Remstof geproduceerd door *Neurospora* spec. (Slagle, Wolcyrz & Price, 1952).

De auteurs werkten met ongezuiverde remstofoplossingen, die zij verkregen door cultuurvloeistoffen van de schimmel te centrifugeren bij 3000 t./min. gedurende 15 min. en vervolgens te filtreren door een Seitz-filter. De remstof bleek volkomen thermostabiel, zelfs bij verhitting op 123 °C gedurende 15 min. Hij trad bij dialyse niet uit en bleef werkzaam binnen een pH traject van 2,2–9,5. Bij centrifugering van een oplossing van T.M.V. en remstof, gedurende 2 h bij 13.000 t./min., sloeg het merendeel van het virus in actieve vorm neer. Het effect van de remming kwam in vitro onmiddellijk tot stand. Bij gescheiden toediening van remstof en virus aan de toetsplant was er zowel een werking vooraf (tot ca. 4 h) als achteraf (tot ca. 30 min.). Gewerkt werd met southern bean mosaic virus (S.B.M.V.) op boon. De resultaten waren bij de opgegeven tijden respectievelijk 27 tegen 54 en 79 tegen 99 vlekken per blad. In het eerste geval werd met een virusverdunning 10^{-1} en een onverdunde remstofoplossing gewerkt, in het tweede geval met een virusverdunning 10^{-2} en een 10^{-1} verdunde remstofoplossing. Bij toevoeging van de remstof vooraf werden de bladeren ermee ingewreven; bij behandeling achteraf ermee besproeid. Indien de remstof na de inoculatie aan de niet geïnoculeerde zijde van het blad werd toegevoegd (gesproeid), trad eveneens remming op. Behalve S.B.M.V. werden nog T.M.V. (verschillende stammen), een tabaksnecrosevirus en tabaksringspot-virus, in aanwezigheid van de remstof, op enige *Nicotiana*-soorten en een tweetal bonerassen getoetst. De resultaten zijn onduidelijk. De inactivering varieerde zowel met de toetsplanten als met de virussen. Bijvoorbeeld tabaks-ringspot-virus werd op tabak (necrotic type) in het geheel niet geremd, daarentegen tabaksnecrosevirus op dezelfde toetsplant voor 98%. De auteurs wijzen alleen op verschillen bij de getoetste plantesoorten en rassen.

Remstof uit bakkersgist (Takahashi, 1942 en 1946).

De isolering en zuivering van de remstof geschiedde als volgt. Bevroren gist werd in een viervoudige gewichtshoeveelheid gedestilleerd water gebracht en 30 min. in een autoclaaf bij ruim 1 atmosfeer verhit. De suspensie werd vervolgens over celite gefiltreerd en aan het filtraat werd het tweevoudige volume aceton of alcohol toegevoegd. Het neerslag werd na afcentrifugeren weer in een hoeveelheid water gelijk aan het oorspronkelijke volume opgenomen. Deze bewerking werd enige keren herhaald. Een kleine hoeveelheid NaCl was nodig om volledige precipitatie te bewerken. Aan de waterige inhibitor-oplossing werd vervolgens per liter 33,3 ml 1% saffranine-oplossing en druppelsgewijs een verzadigde neutrale oplossing van loodacetaat

toegevoegd. Met kaliumoxalaat en $CaCl_2$ werden respectievelijk overmaat Pb en oxalaat weggenomen. Aan de uiteindelijk verkregen heldere oplossing werd opnieuw aceton toegevoegd. Het neerslag werd vervolgens in 2 N HCl opgelost en 30 min. op een kokend waterbad verhit(!). Tenslotte werd de remstof met het zes- tot zevenvoudige volume aceton geprecipiteerd en in vacuo gedroogd.

De elementaire samenstelling was C 39,7; H 5,85; S 0 en chloride 1,4. De stof reduceerde geen Fehling-oplossing, gaf echter een positieve α-naftol-reactie volgens Molisch. In de latere mededeling werd het eerder uitgesproken vermoeden over het polysaccharide karakter bevestigd. De stof bleek bij hydrolyse gedurende ca. 2 h met 5% HCl of H_2SO_4(?), 85–88% reducerende suikers op te leveren en wel overwegend glucose. Bij elektroforese gedroeg de stof zich als een homogene verbinding. Een oplossing die 50 γ T.M.V. en 50 γ remstof/ml bevatte, leverde bij toetsing op *Nicotiana glutinosa* gemiddeld per bladhelft 1 vlek op tegen 77 vlekken bij de controle. Bij iedere halvering van de remstof-concentratie nam de virusactiviteit in de oplossing met ca. een factor twee toe. Hieruit concludeerde de auteur tot een chemische reactie tussen virus en remstof (?).

Bij de besproken hoogmoleculaire remstoffen zou men twee groepen kunnen onderscheiden, nl. een thermolabiele en een thermostabiele groep. De eerste groep schijnt eiwitachtige verbindingen te bevatten; de andere groep componenten met een overwegend polysaccharide karakter. Drie van de zeven niet dialyseerbare inhibitoren, die ter sprake kwamen, zijn in „zuivere" toestand afgescheiden en nader geanalyseerd. Bij slechts één hiervan is de homogeniteit van het preparaat aangetoond, nl. bij de door TAKAHASHI (1946) onderzochte remstof.

3. CONCLUSIES EN THEORIEËN OVER DE AARD DER REMSTOFWERKING

Als resultaat van hun onderzoek meenden KUNTZ & WALKER (1947), dat niets er op wees, dat het remmende vermogen van zekere plantesappen te wijten zou zijn aan veranderingen van de toetsplant. Eerder zouden zeer bepaalde chemische verbindingen in sap van spinazie en andere *Chenopodiaceae* het virus inactief maken. Dit effect zou momentaan tot stand komen, maar hoe zij zich de wisselwerking remstof-virus in concreto voorstellen is niet duidelijk. Zij wijzen er nl. ook op, dat bijvoorbeeld door toevoeging van ethanol tot een gehalte van 50% aan een mengsel van T.M.V.-houdend sap en spinazie-extract, het virus in de bovenstaande vloeistof weer actief wordt.

Ook KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948) geven aan, maar dan op grond van directe waarnemingen, dat de meest voor de hand liggende verklaring voor de remmende werking van het „glycoproteïne" uit *Phytolacca esculenta*, de binding met het virus zou zijn. Hierbij zou de inhibitor dan groepen in het virusmolecule blokkeren, die essentieel zouden zijn voor het tot stand komen van de infectie. Zij wijzen er dan echter onmiddellijk op, dat er andere feiten zijn, die niet met deze opvatting stroken. Niet alle eiwitachtige stoffen, die zich met T.M.V. binden (bijvoorbeeld clupeïne en globine) bezitten een inactiverende werking. Een loutere binding zou dus hiervoor niet voldoende zijn. Zij ontnemen deze constatering vervolgens weer alle bewijskracht door op te merken, „tenzij verschillende stoffen zich met verschillende groepen zouden binden". Een meer overtuigend argument tégen is, naar hun zeggen, dat er geen proportionaliteit bleek te bestaan tussen de hoeveelheid aanwezig T.M.V. en de hoeveelheid „glycoproteïne", die voor volledige inactivering van het virus benodigd was. Hoe hoger de virusconcentratie, hoe kleiner namelijk het gewichtsquotiënt van remstof en virus was.

Weintraub & Gilpatrick (1952) kwamen ten aanzien van de werking van de remstof uit duizendschoon ook niet tot een definitieve uitspraak ten gunste van een van beide mogelijkheden. Dit in tegenstelling met wat Bawden (1954, blz. 43) in zijn overzichtsartikel suggereert. Wel merken Weintraub & Gilpatrick op, dat de enige resultaten in hun onderzoek, die ten gunste van een werking op het virus pleiten, verkregen werden in proeven met gescheiden toediening van remstof en virus aan de toetsplant. Hierbij werd nl. in het geheel geen remming geconstateerd. Daar zij deze resultaten niet nader aangeven en de opzet der proeven bovendien zodanig was, dat kwantitatieve verschillen niet aan het licht konden treden, is de waarde van de experimenten voor de opheldering van het remmingsmechanisme dubieus. Het is op grond daarvan ook niet mogelijk te beslissen, of de inhibitor uit duizendschoon inderdaad wezenlijk verschilt van die uit anjer. Het gedrag tijdens centrifugering bij laag toerental, waarbij volgens Weintraub & Gilpatrick een belangrijk deel van de remstof werd neergeslagen, suggereert inderdaad een verschil.

Bawden & Freeman (1952) nemen nagenoeg als vaststaand aan, dat in het algemeen virusinhibitoren direct op de waardplant inwerken. Dit zou sterk worden gesuggereerd door het uiteenlopende effect, dat inhibitoren op verschillende plantesoorten sorteren. Hierop zou de aard van het virus niet van invloed zijn. De auteurs werkten met T.M.V., bushy stunt virus en een tabaksnecrosevirus op *Nicotiana glutinosa* en met eerst en laatst genoemd virus ook op boon. Vanwege overeenkomst in gedrag tussen de inhibitoren geproduceerd door *Trichothecium roseum*, die geen binding met het virus aangaan, en bijvoorbeeld de remstof uit *Phytolacca esculenta*, achten Bawden & Freeman het onwaarschijnlijk, dat de waargenomen remstof-virus-binding bij laatstgenoemde een rol bij de remming speelt. Welke andere overeenkomst in gedrag, dan het teweegbrengen der remming zelf wordt bedoeld, is niet duidelijk, te meer daar er nog wordt gewezen op onderlinge verschillen in werking tussen de beide, van de schimmel afkomstige, inhibitoren. Bij het zoeken naar een verklaring van de werking der remstoffen op de toetsplanten, geven Bawden & Freeman twee mogelijkheden aan. Naar analogie van verschijnselen bij bacteriofagen introduceren zij allereerst het begrip virusreceptor in de plantevirologie. Zij bedoelen met receptoren, die plaatsen in de cellen, waar het virus bij inoculatie dient aan te grijpen, wil een infectie slagen.[1]) Inhibitoren zouden nu werkzaam kunnen zijn door deze plaatsen te bezetten. Verwijzend naar de sterk verschillende samenstelling der inhibitoren, die nochthans alle dezelfde werking zouden hebben, wordt de receptortheorie weer opgegeven. In plaats van aan de remstoffen de functie van met de virusdeeltjes om een bepaalde plaats wedijverende verbindingen toe te kennen, menen Bawden & Freeman, dat het redelijker is aan te nemen, dat inhibitoren de fysiologie van de gastcel zodanig wijzigen, dat deze niet langer de virusvermeerdering bevordert.

Het komt ons voor, dat de verscheidenheid in geaardheid van de remstoffen als een evengrote bedenking tegen déze opvatting kan gelden, als Bawden & Freeman hierin tegen de receptortheorie menen te zien. Zij redeneren dit bezwaar echter weg door op te merken, dat voor een dergelijke op de fysiologie invloed uitoefenende werking niets anders nodig is, dan dat de remstof verschilt van normale celbestanddelen en dat hij de cel tot een of andere ongewone acti-

[1]) Eerder was in dit verband door Thung (1951) van *attachment-process* gesproken, zijnde de inpassing van het complete virusdeeltje in het protoplasma van de gastcel.

viteit prikkelt. Als ondersteuning hiervoor worden publikaties aangehaald, waaruit blijkt, dat extracten van bepaalde planten wel de eigen soort, maar niet de planten van andere soorten tegen infectie beschermen (BHARGAVA, 1951 en VAN DER WANT, 1951). Zoals in I.2. al werd uiteengezet baseerde VAN DER WANT (1951) op de hier bedoelde waarnemingen met anjersap zijn indeling in relatieve en absolute inhibitoren. (Onder deze laatste verstond hij verbindingen, die ook sapinfectie binnen de eigen soort onmogelijk maken). Er zij hier op gewezen, dat in Hoofdstuk II van dit proefschrift is aangetoond, dat ook andere plantesoorten dan anjer, bij bepaalde concentraties van de remstof uit deze plant in de inoculatie-vloeistof, weinig bescherming tegen virusinfectie genieten, doch, dat zelfs anjer er niet ongevoelig voor is.

Geheel in de lijn van BAWDEN's zienswijze, is de door BENDA (1956) gegeven interpretatie van de verschijnselen met de remstof uit *Tetragonia expansa* ten opzichte van tabaks-ringspot-virus op *Vigna sinensis*. Op deze toetsplant constateerde genoemde auteur, dat bij gebruik van de ongezuiverde remstof in het sap als zodanig, of van de „gezuiverde" inhibitor bij toevoeging van oxalaat, de ziektesymptomen bij inoculatie van virus-remstof-mengsels niet alleen geringer waren, maar ook later opkwamen (een tot twee dagen) dan bij de viruswatermengsels; ook zette de ontwikkeling van het aantal vlekken bij aanwezigheid van de remstof langer door (nog ca. drie dagen). Het totaal aantal vlekken per enkelvoudig blad was, zowel bij de toets – als bij de controle-series vrij laag, nl. maximaal 30. Het verschijnsel der vertraagde opkomst scheen alleen duidelijk tot uiting te kunnen komen bij gelijktijdig aanwezig zijn van remstof en oxalaat. Oxalaat alleen bleek het aantal lokale vlekken te verhogen. BENDA meent nu, dat de remstof cellen tijdelijk ongeschikt maakt voor virusvermeerdering of -transport en dat hoe meer tijd de cel nodig heeft om de inhibitoractiviteit te doen „slijten", hoe minder virus in actieve vorm zal blijven. Dit laatste zou dan weer worden bepaald door de dosis remstof die in de cel zou zijn geraakt. Genoemde vertraging in opkomst der ziektesymptomen bleek overigens niet op te treden bij toetsing van een mengsel van T.M.V. en inhibitor op *Nicotiana glutinosa*. Indien de remstof uit *Tetragonium* door trypsine werd vervangen, bleek het vertragingsverschijnsel ook niet meer bij ringspot-virus op *Vigna sinensis* op te treden.

Daar de oorzaak van het stimulerende effect van oxalaat op de infectie niet duidelijk is – de auteur suggereert een werking op het Ca in het protoplasma – is de waarde van het geconstateerde verschijnsel voor een verklaring van het fenomeen der virusremming voorlopig nog gering. Dit temeer, daar de waarneming vooralsnog op zich zelf staat. Tegen de door BENDA gegeven verklaring kan bovendien nog worden aangevoerd, dat bladcellen ook buiten aanwezigheid van remstof binnengedrongen virus kunnen „uitschakelen" (nog te bespreken werk van JEENER & VAN RIJSSELBERGE, 1955).

BENDA (1956) beschrijft verder nog experimenten, waarbij hij bladeren van *Vigna sinensis*, die met een ringspot-virusoplossing respectievelijk gemengd met H_2O, remstof + oxalaat of oxalaat waren geïnoculeerd, voor een deel 24 h later met ultraviolet licht bestraalde. Hij deed dit in navolging van werk van BAWDEN & HARRISON (1955). Onder invloed van de remstof(!) bleef het virus langer gevoelig voor deze bestraling. De betekenis, die het oxalaat naast de remstof op het uiteindelijk effect der bestraling had, kon uit het gepubliceerde cijfermateriaal niet worden afgeleid. De werking van de remstof alleen werd nl. niet onder-

zocht en bovendien werd met wisselende en niet vermelde virusconcentraties gewerkt.

Een geheel andere verklaring voor het mechanisme der virusremming geven SLAGLE et al. (1952). Zij constateerden, dat geconcentreerde oplossingen van de remstof, die door *Neurospora sitophila* wordt geproduceerd, zichtbare beschadigingen der behandelde bladeren teweegbrachten. Hoewel zij werkten met een ongezuiverd produkt, scheen er een correlatie te bestaan tussen het vermogen tot remmen en tot het beschadigen van een bepaalde plant. Op grond daarvan poneren deze auteurs de stelling, dat de werkzaamheid een gevolg zou zijn van het doden der verwonde cellen, die anders als basis voor de virusvermeerdering hadden kunnen dienen.

Het is zeer zeker voor de hand liggend om een dergelijk mechanisme te veronderstellen in gevallen, waar macroscopisch zichtbare beschadigingen door het gebruik van de remstof optreden. De generalisering van SLAGLE et al., dat dit mechanisme ook zou gelden voor trypsine, melk, plantesappen, stofwisselingsprodukten van schimmels in het algemeen en sappen van fijngemaakte insekten, lijkt ons echter niet verantwoord.

Het moet zijn opgevallen, dat bij alle beschouwingen over het mechanisme der virusremming bij planten het proces der virusinfectie zelf nauwelijks ter sprake is gekomen. Dit vindt zijn oorzaak in het feit, dat onze kennis van de fysisch-biochemische wisselwerking tussen virus en plant nog uiterst gering is en niet kan bijdragen tot een gefundeerde verklaring van de werkzaamheid der inhibitoren. Veeleer heeft omgekeerd de studie der virusinhibitie, buiten een praktische waarde voor de ziektebestrijding, juist betekenis als mogelijkheid tot benadering van het probleem der infectie.

Ook zal men aan de hand van de verschillende hypothesen tot het inzicht zijn gekomen, dat het uiteindelijk waarneembare verschijnsel van een verminderd of onderdrukt ziektebeeld ten gevolge van de aanwezigheid van een remstof, op zeer uiteenlopende wijzen tot stand kan komen. Nog eens in het kort samengevat: dit effect kan worden verkregen, zowel door een werking in vitro tussen remstof en virus, als door een werking via de plant. In dit laatste geval kan het virus direct bij de inoculatie al verhinderd worden effectief met de plant in relatie te treden, maar de inhibitor kan zich ook in het stadium der virusvermeerdering pas doen gelden.

Een hypothese, die het verschijnsel der virusremming door een enkele werkzaamheid van de remstof wil verklaren, is weinig verhelderend en bergt bovendien het gevaar in zich, dat de werkelijke problematiek uit het oog verdwijnt en verdere experimenten overbodig schijnen. Ons inziens kleven dergelijke bezwaren aan de door BAWDEN & FREEMAN (1952) naar voren gebrachte hypothese der virusremming, waarin zij stellen, dat deze een gevolg is van de beinvloeding van de fysiologie van de toetsplant. Weliswaar maakt BAWDEN (1954) later onderscheid tussen *inhibitors of infection* en *inhibitors of virus increase*, maar consequenties voor een onderscheiden verklaring van hun werkzaamheid heeft dit niet. BAWDEN (1954, p. 55) schrijft nl. woordelijk: „although the phenomena of inhibition of infection and inhibition of virus increase look very dissimilar, there may be no fundamental differences."

Nieuwere inzichten omtrent de virussynthese en de infectieuze component der virus-nucleoproteïden maken het in tegenstelling tot bovengegeven uitspraak van BAWDEN waarschijnlijk, dat zo'n fundamenteel verschil wèl bestaat.

Gezien de infectieuziteit van de R.N.Z.-component[1]) van T.M.V. (GIERER & SCHRAMM, 1956) en de afzonderlijke synthese van de R.N.Z.- en eiwit-component in met dit virus besmette tabak (VAN RIJSSELBERGE & JEENER, 1955), zou de infectie van planten nl. zeer wel met de „ontmanteling" van de nucleïnezuurcomponent kunnen inzetten. Er zou dan een overeenkomst bestaan met de infectie van bacteriën door fagen (HERSHEY & CHASE, 1952). Wanneer men deze stelling accepteert, dan komt het ons logisch voor de analogie ook verder door te trekken. Dit betekent, dat wij bij het onderzoek naar het mechanisme der virusinfectie en der virusremming de receptortheorie als werkhypothese bij het onderzoek zouden willen gebruiken.

Dit is te meer voor de hand liggend, nu is gebleken, dat receptorfunctie en functie om de nucleïnezuurcomponent uit zijn eiwitomhulsel te doen treden aan éénzelfde stof kan zijn gebonden (WEIDEL, KOCH & KELLENBERGER, 1955). Genoemde onderzoekers slaagden erin uit de celwand van *Escherichia coli* stam B een duidelijk gekarakteriseerde, hoog moleculaire, glycoproteïde-verbinding te isoleren, mol. gewicht $11{,}4 \times 10^6$, die per molecule een T_5-faagdeeltje bindt. Hierbij treedt in vitro een inactivering van het faagdeeltje op, daar de binding resulteert in een uittreden van het D.N.Z.[2]). De inactivering der T_5-deeltjes in vitro tengevolge van het uittreden van D.N.Z. is niet momentaan, maar verloopt binnen een termijn van ca. 30 min.

BAWDEN (1954, p. 46) sprak destijds zijn twijfel uit over de vergelijkbaarheid der verschijnselen bij de virusinfectie van bacteriën enerzijds en planten anderzijds. Hij wees er op, dat de adsorptie van bacteriofaagdeeltjes aan een bacterie een stap is in het penetratie-proces, in tegenstelling tot het introduceren van virus bij planten, dat via wonden zou geschieden. Het is niet duidelijk, wat BAWDEN hiermee beoogt. Doelt hij erop, dat receptoren bij planten voor het tot stand komen van een infectie overbodig zouden zijn of wil hij suggereren, dat de plaats van de receptoren bij planten niet effectief voor de infectie is? Betreffende het laatste kan worden gewezen op het feit, dat bij bacteriën receptoren zijn gevonden, die zodanig in de bacteriewand liggen, dat zij niet zonder meer door fagen kunnen worden benaderd. WEIDEL, KOCH & BOBOSCH (1954), geven bijvoorbeeld bij *Escherichia coli* B aan, dat de receptoren voor de T_4-faag ten dele eerst toegankelijk worden, nadat men een meer naar buiten gelegen laag van de celwand met fenol heeft weggenomen. Aan de functie van de wonden bij het tot stand komen van de infectie zal later nog enige aandacht worden besteed.

Ook JEENER & VAN RIJSSELBERGE (1955), wezen bij de verklaring van hun infiltratie-proeven met door C^{14} en P^{32} gemerkt T.M.V. op een mogelijke analogie met verschijnselen bij bacteriën. Zij namen waar, dat een infiltratie van *Nicotiana glutinosa* bladeren met een oplossing, die 250 γ „gemerkt" T.M.V./ml bevatte, resulteerde in slechts een tot twee lokale vlekken per bladhelft, terwijl zich 48 h na de infiltratie toch een grote hoeveelheid virus in de parenchymcellen bevond, en wel in plastiden, mitochondriën en dergelijke. Uit radioactiviteitsmetingen en uit de bepaling van de verhouding tussen C^{14} en P^{32} berekenden zij dit aantal op minstens 10^6 virusdeeltjes per cel. De deeltjes, die in de corpusculaire fractie (plastiden, mitochondriën en dergelijke) van de betreffende bladeren aanwezig waren, bleken echter niet infectieus te zijn. Daarentegen kwam in de vloeistof, die de oplosbare celbestanddelen bevatte, wel infectieus virus

[1]) R.N.Z. = ribonucleïnezuur.
[2]) D.N.Z. = desoxy-ribonucleïnezuur.

voor, doch het was onmogelijk onderscheid te maken tussen virus, afkomstig uit de intercellulairen en virus, afkomstig uit het cytoplasma. Er waren verder in het geheel geen aanwijzingen, dat er in de met het radioactieve virus geïnfiltreerde bladeren virusvermeerdering had plaats gehad. Dat het achterwege blijven hiervan niet het gevolg was van een te hoge virusconcentratie in het blad, hetzij dat deze als zodanig, dan wel ten gevolge van haar radioactiviteit een ongunstige invloed had, bewezen JEENER & VAN RIJSSELBERGE door reeds geïnfiltreerde bladeren met dezelfde gemerkte T.M.V.-oplossing in te wrijven. In dat geval kwamen ontelbare vlekjes op deze bladeren tot ontwikkeling. Naar aanleiding van hun resultaten opperen deze auteurs de hypothese, dat de celwanden der epidermiscellen een stof bevatten, die uit het „inactieve" (lees: complete) virus het bestanddeel R.N.Z. vrijmaken, dat verantwoordelijk is voor de zelfreproductie. In de celwanden der parenchymcellen zou een dergelijke „substance activatrice" ontbreken.

Enigszins vergelijkbaar met de boven besproken infiltratieproeven zijn naar ons idee de volgende, door BAWDEN (1954) aangeduide, proefresultaten. Bij inoculatie van bladeren van *Nicotiana glutinosa* met een geconcentreerd mengsel van T.M.V. en ribonuclease, kwamen geen lokale vlekken tot ontwikkeling. Daarentegen bleek perssap, een of meer dagen later uit dergelijke bladeren gewonnen en op de gewone wijze uitgewreven, infectieus te zijn.

Wij zouden uit beide typen van proeven deze conclusie willen trekken: het virus, wil het zich in een geïnoculeerd blad als infectieus doen gelden, moet bij het binnenkomen in een cel een specifieke weg volgen.

Er is verband gelegd tussen de tijd, die een blad nodig heeft om zijn wonden, veroorzaakt door het gebruik van hulpstoffen bij de inoculatie als carborundum, celite enz. te sluiten en de tijdsduur, waarbinnen bepaalde virusremstoffen na de inoculatie nog effect sorteren (BAWDEN & HARRISON, 1955). Welke aard en diepte dergelijke verwondingen dienen te hebben om een inoculatie succesvol te doen zijn, is echter onbekend. Het enige vaststaande is, dat de verwonding niet zodanig moet zijn, dat de betreffende cel of cellen eraan te gronde gaan. Dat hiermee echter het succes van een inoculatie nog niet is verzekerd, blijkt indirect uit experimenten van BENDA (1956, a). Deze auteur voerde met behulp van een micromanipulator proeven uit, waarbij hij van bladharen van *Nicotiana glutinosa* zaailingen één enkele cel per haar inoculeerde. Er werd gewerkt met een mengsel van twee T.M.V.-stammen (tezamen 22 mg virus/ml). Na het opbrengen van minder dan 10^{-8} ml van het inoculum op de te inoculeren cel verwondde hij deze door middel van een glasnaald. Van 1157 op deze wijze behandelde haren bleken er 694 na een dag nog in leven. Aan de basis van 70 hiervan ontstond een necrotische vlek. Dus ook al overleeft een cel de inoculatie, dan is er bij deze wijze van inoculeren toch nog maar 10% kans, dat het virus daar wordt gebracht, waar het terecht hoort te komen om het proces der virusinfectie te beginnen.

BAWDEN & FREEMAN (1952) hebben, zoals eerder werd opgemerkt, de verscheidenheid der virusinhibitoren aangevoerd als argument om de opvatting, dat zij receptoren zouden kunnen blokkeren of onwerkzaam maken, ter zijde te schuiven. Daar het uitschakelen der receptoren ons inziens op verschillende manieren mogelijk is, lijkt dit argument echter weinig steekhoudend. Als men zich voorstelt, dat de receptor deel uitmaakt van de ruimtelijke structuur, dan zou toetreden van virus onmogelijk kunnen worden gemaakt, indien de

inhibitormoleculen met de omringende structuren in reactie zouden treden.

Wanneer men de receptor als drager van een bepaalde werkzame groep beschouwt (enzym) en het virus in het stadium der infectie als substraat, zou men virusremstoffen met enzymremstoffen kunnen vergelijken. Bij deze laatste onderscheidt men competitieve en niet-competitieve inhibitoren (zie bijv. NEILANDS & STUMPF, 1955). Eerstgenoemde inhibitoren hebben doorgaans vergaande gelijkenis met het substraatmolecule, in tegenstelling tot de laatste, die er vaak zeer weinig overeenkomst in structuur mee hebben. Ook grijpen de niet-competitieve enzyminhibitoren klaarblijkelijk op andere punten dan de competitieve aan.

Tot slot willen we nog in het kort ingaan op de betekenis van de receptortheorie voor de interpretatie van een tweetal resultaten van het eigen onderzoek. Het betreft de waarneming uit III.4.1., dat de remstof uit anjer ook korte tijd na de inoculatie in staat is het virus onwerkzaam te maken, en de waarneming uit III.5.1., dat de anjerinhibitor R.N.Z. in dezelfde mate als T.M.V. verhindert, een infectie teweeg te brengen. De tijd, waarbinnen nog een duidelijke neutraliserende werking optrad, was vrij kort (ca. 30 min.), vooral bij oudere bladeren. Deze neutraliserende werking zou kunnen worden geïnterpreteerd als een verdringing van aan receptoren gebonden virus door de remstof. Immers, ook indien de werking van de receptorsubstantie tweeledig is, zoals bij *Escherichia coli B* en T_5 (WEIDEL, KOCH & BOBOSCH, 1954), verloopt het uittreden van het D.N.Z. in vitro binnen een meetbaar tijdsbestek.

De werking van de anjerremstof op R.N.Z. van T.M.V. wordt, indien men aan de receptoren een dubbele functie moet toekennen niet alleen verklaarbaar, maar vormt zelfs een steun voor de geldigheid der receptortheorie bij planten. Immers, niet alleen het intacte virus moet er aangrijpen, maar het hieruit vrijgemaakte nucleïnezuur moet vermoedelijk door de receptordeeltjes heen dringen (WEIDEL & KELLENBERGER, 1955). Een stof, die zo'n deeltje onwerkzaam maakt, doet dit dus zowel voor het virus als voor het nucleïnezuur hieruit.

Samenvattend zouden wij willen opmerken, dat de receptortheorie voor het benaderen van verschijnselen van virusinfectie en virusremming waardevol is en zeker niet mag worden veronachtzaamd. Haar postulaten hebben op het verwante gebied der bacteriofagie een belangrijke betekenis gekregen, terwijl ook nieuwe inzichten en resultaten van bepaalde proeven op het terrein der plantevirologie er steun aan geven. De theorie pretendeert uiteraard niet alle verschijnselen, die betrekking hebben op de virusaantasting bij planten, op te helderen. Integendeel, zij beperkt zich juist tot één fase van het fenomeen, nl. de fase der infectie.

Naast een virusremming als gevolg van een effect op de toetsplant, teweeggebracht door het onwerkzaam maken of blokkeren van receptoren, blijft een remming mogelijk door beïnvloeding van de fase der virusvermeerdering. Daar hierbij hoogstwaarschijnlijk stofwisselingsprocessen van de waardplant betrokken zijn, die de vorming van normale en essentiële celbestanddelen bewerken, zal een beïnvloeding der virusvermeerdering tot een beschadiging van de besmette plant kunnen leiden. Een bescherming van de plant tegen een virusaantasting kan, naar onze mening, dan ook beter gezocht worden in een beïnvloeding van de fase der infectie dan in een beïnvloeding van de fase der virusvermeerdering.

Behalve een werking van de remstof op de plant blijft in bepaalde gevallen de mogelijkheid van een interactie remstof-virus in vitro bestaan. Deze wisselwerking kan behalve een denaturering van het virus-nucleoproteïde ook een verhindering van het in werking treden van het receptormechanisme ten gevolge hebben.

HOOFDSTUK VI

ALGEMENE SAMENVATTING

De inhibitor uit anjer bleek een remmende werking uit te oefenen op zeer verschillende virussen bij toetsing op uiteenlopende plantesoorten. Onderzocht werden 14 virussen en 20 plantesoorten. Er werden geen virussen aangetroffen, die ongevoelig waren voor de remstof. De mate van de remming was voor alle viren afhankelijk van de plantesoort, waarop zij werden getoetst. Ten aanzien van de werkzaamheid van de remstof konden de onderzochte planten worden onderscheiden in zeer gevoelige en weinig gevoelige soorten. Deze laatste bleken systematisch verwant. Zij behoren alle tot de orde der Centrospermae. De verschillen in gevoeligheid bleken niet van kwalitatieve, maar van kwantitatieve aard. Zelfs bij anjer werd de virusbesmetting door een geschikte remstofconcentratie in het inoculum verminderd. De beïnvloeding der besmetting werd uitgedrukt in een activiteitspercentage.

Een verlaging van de virus- en inhibitorconcentraties in de toetsvloeistoffen resulteerde, bij gelijkblijvende concentratieverhouding, in een verhoging van de activiteitspercentages. Een verlaging van de remstofconcentratie had in overeenstemming hiermee een sterker effect op de grootte der activiteitspercentages dan een verhoging van de virusconcentratie in dezelfde orde. Bij optimale inhibitorconcentraties konden zeer hoge virusconcentraties volledig onwerkzaam gemaakt worden, bijvoorbeeld 330 γ T.M.V./ml op *Nicotiana glutinosa*, door menging met een gelijk volume anjersap.

De omvang van de remming bleek onafhankelijk van de tijd die virus en remstof in vitro met elkaar in contact waren. Ook bleek er voor eenzelfde virus en waardplant geen constante virus-remstof-verhouding te bestaan in mengsels met activiteitspercentages van circa 0. Daarom werd het onwaarschijnlijk geacht, dat de remming een gevolg zou zijn van een reactie tussen virus en remstof in vloeistofmilieu. Het onafhankelijk naast elkaar voorkomen van beide in vitro kon door ultracentrifugering van sap van mozaiekzieke anjers worden bevestigd. Hierbij werd nl. actief virus afgescheiden.

Op grond van de verschillen in gevoeligheid tussen de onderscheiden plantesoorten en het bestaan van optimale remstofconcentraties, werd verondersteld, dat de inhibitor via de toetsplant werkzaam is. Gescheiden toediening van virus en remstof aan afgesneden *Nicotiana glutinosa* bladeren resulteerde inderdaad, bij gebruik van de remstof zowel vóór als na de inoculatie, in een duidelijke beïnvloeding der besmetting. De preventieve werking strekte zich uit over meer dan 3 h, de werking achteraf (bij even dompelen) over een periode van ongeveer 30 min. Het maximale neutraliserende effect werd bereikt door een dompeling van 5 min. of minder.

Infectieus ribonucleïnezuur (R.N.Z.) van T.M.V. werd evenals het intacte virus op *Nicotiana glutinosa* door de anjerinhibitor geremd. De remming werd geconstateerd zowel bij inoculatie van een mengsel van R.N.Z. en inhibitor, als bij toediening van laatstgenoemde aan de bladeren vóór de inoculatie. De

remstofwerking is dus kennelijk niet het gevolg van een interactie tussen de inhibitor en de eiwitachtige buitenkant van het virus.

De sedimentatiesnelheid van de remstof werd in een analytisch ultracentrifugeonderzoek bepaald, door biologische toetsing van de bovenstaande vloeistof. De hieruit te berekenen sedimentatieconstante van 1,4 wijst op een moleculairgewicht van de remstof van minimaal 10.000. Directe waarneming der sedimentatie, door middel van het Schlieren-optische systeem was niet mogelijk, daar de remstofconcentratie in de onderzochte oplossingen te gering was.

De isolering van de remstof werd uitgevoerd door preparatieve ultracentrifugering en door precipitatie met $(NH_4)_2SO_4$, bij verzadiging der oplossingen met dit zout tot 50 %. Door ultracentrifugering werd een absolute concentrering van de remstof in de onderste lagen van de bovenstaande vloeistof bereikt. In de oplossingen der neerslagen werd, bij beide methoden, slechts een relatieve concentrering tot stand gebracht.

De zuivering van de inhibitor werd op semi-microschaal met behulp van papierelektroforese beproefd. Uitgaande van donkergekleurde remstofhoudende oplossingen werden op deze wijze kleurloze waterheldere vloeistoffen met inhibitoractiviteit verkregen. Na elektroforese werd ongeveer 10 % van de oorspronkelijk opgebrachte activiteit in de extracten der elektroferogrammen teruggevonden. De remstof bleek bij spectrofotometrische meting van deze oplossingen geen absorptiemaximum in het ultraviolet te hebben. De inhibitor gedroeg zich in het elektrische veld, bij spanningen van 100–360 V en in een pH gebied van 5,4–8,1 als een neutrale verbinding. Hij werd, tengevolge van vloeistofstroming, in een smalle zone van de kathode-helft der elektroferogrammen opgehoopt. Daar gebruik van een boorzuurbuffer niet leidde tot een actieve verplaatsing in het elektrische veld, mocht worden geconcludeerd, dat de remstof naar alle waarschijnlijkheid geen suiker als wezenlijk bestanddeel van zijn molecule bevat. In de extracten der remstofhoudende zones bleek, bij papierchromatografische analyse, naast enige vrije suikers en (neutrale) aminozuren, ook een eiwitachtige verbinding voor te komen. Deze laatste kon echter nog niet met de inhibitor worden geïdentificeerd, daar ook in de naburige zones, zonder biologische activiteit, eiwitachtige verbindingen werden aangetroffen.

De virusremmende activiteit van de inhibitor uit anjer werd geïnterpreteerd als een blokkering van voor de totstandkoming der virusinfectie noodzakelijke posities nabij het bladoppervlak. De gelijke remming van intact T.M.V. en het hieruit te bereiden R.N.Z. zou erop kunnen wijzen, dat beide via dezelfde plaatsen tot besmetting moeten komen. Deze zogenaamde receptortheorie van de virusinfectie is op het verwante terrein der bacteriofagie sinds jaren aanvaard en wordt hier steeds meer door de feiten bevestigd. Gezien de resultaten van recente infiltratieproeven met „gemerkt" T.M.V., het infectieuze bestanddeel van T.M.V. en de nieuwste inzichten aangaande de virusvermeerdering in planten, schijnt zij echter ook op het terrein der plantevirologie geldigheid te bezitten.

Bij een bestudering van de literatuur betreffende aard en werking van sommige in de natuur voorkomende inhibitoren van plantevirussen werd de receptortheorie gesteld tegenover andere opvattingen aangaande het remmingsmechanisme. Geconcludeerd werd, dat, voorzover het via de plant werkende verbindingen betreft, de receptortheorie van waarde is en niet mag worden veronachtzaamd. Naast remstoffen, wier werking op deze wijze kan worden verklaard, zijn er echter andere, die kennelijk eerst in de fase der virusvermeerdering werkzaam zijn.

SUMMARY[1])

BEHAVIOUR AND NATURE OF A VIRUS INHIBITOR OCCURRING IN DIANTHUS CARYOPHYLLUS L.

CHAPTER I

INTRODUCTION

Following investigations concerning a virus disease of carnation (NOORDAM et al., 1951), it was found that sap of carnation plants had a strong inhibitive power regarding the transmission of certain viruses to tobacco and French bean (VAN DER WANT, 1951 and 1953). Apparently virus transmission from carnation to carnation or sweet William was not affected, whereas virus inhibition in transmissions to *Gomphrena globosa* was less pronounced as compared with tobacco or French bean (VAN DER WANT, 1953).

In the present investigations the author has first studied the effect of carnation sap on various viruses and various host plants to gain a better understanding of the mode of action of the inhibitor involved. An approach was further made by studying the interactions between virus and inhibitor *in vitro* and *in vivo*. Furthermore an attempt was made to isolate and identify the inhibitor. Finally a survey of literature regarding naturally occurring plant virus inhibitors was made and a critical analysis of theories interpreting their action given. In the course of this the phenomenon of virus infection of higher plants was also considered.

[1]) The author is greatly indebted to Dr. A. H. GOLD, Department of Plant Pathology, University of California, Berkeley, California, for correcting the English text.

CHAPTER II

RANGE OF ACTION OF THE INHIBITOR FROM CARNATION

The inhibitor from carnation appeared to be active against various viruses in tests on many different plant species. Fourteen viruses and 20 plant species were investigated (tables 1, 2 and 3).

Tests were performed in the following manner: Saps of virus-diseased plants or dilutions thereof were mixed in equal volumes with undiluted or diluted press sap of frozen healthy carnation shoots. In certain cases a concentrate of carnation sap was used. This had been prepared by freeze-drying after clarifying the sap by low speed centrifugation (1 h. at a force of approximately 11,000 *g*). Generally in tests those plant species were used which react with local necrosis to the given viruses. Unless stated otherwise leaves were left on the plants when tested. Leaves were inoculated after dusting with carborundum powder. Immediately after, they were rinsed with tap water. Table 4 gives a summary of the species and the plant organs or parts of organs used in these experiments.

The results were transformed into ,,activity percentages". In case of local reaction each activity percentage represents the mean activity quotient of a series times 100. The activity quotient is the ratio of:

$$\frac{\text{Number of lesions produced by inoculum containing carnation sap}}{\text{Number of lesions produced by inoculum without carnation sap}}$$

per leaf, per comparable pair of leaves or per pair of cotyledons. When one or more of the activity quotients in a series was larger than 1, the statistical significance of the inhibitory effect in the whole series has been checked by applying WILCOXON's test for symmetry at the 3 % level. If this significance could not be confirmed, the activity percentage was put on a level of 100.

In case of systemic infection the activity percentage represents the activity quotient $\times$ 100. The former is calculated in the following manner:

$$\frac{\dfrac{\text{Number of infected plants obtained with test inoculum}}{\text{Total number of plants in test series}}}{\dfrac{\text{Number of infected plants obtained with control inoculum}}{\text{Total number of plants in control series}}}$$

The results of the experiments concerned have been summarized in tables 5, 6, 7 and 8. Within each virus-group of table 6, unless otherwise stated, inoculations have been performed simultaneously, using inocula composed from the same virus and inhibitor-containing stock solutions.

The inhibitor proved to be active against all viruses tested. However, the inhibitory effect depended largely on the nature of the individual plant species. The species on which the inhibitory effect was weakest, appeared to belong to the same taxonomic group, viz. the order Centrospermae.

From the data summarized in tables 6 and 8 it is concluded that the origin of differences in inhibitory effect on distinct species was quantitative rather than qualitative. Also carnation itself could be protected against infection with car-

nation mosaic virus to some degree. This was clearly demonstrated if concentrated carnation sap was used (table 8).

Mixtures of diluted virus solutions and diluted inhibitor solutions, having the same concentration ratio, showed an increase in activity percentage with decreasing concentration of the active components. This is in accordance with the phenomenon that the activity percentage was more strongly affected by a decrease in inhibitor concentration than by a comparable increase in virus concentration.

Since no constant proportion virus-inhibitor could be established in mixtures having activity percentages equalling zero on a given test plant, a chemical reaction virus-inhibitor *in vitro* is not probable (table 7).

At apparently optimal inhibitor concentrations high virus concentrations were fully inhibited (e.g. 330 γ TMV/ml on *Nicotiana glutinosa* when mixed before inoculation with an equal volume of untreated carnation sap).

CHAPTER III

FURTHER INVESTIGATIONS ON THE MECHANISM OF VIRUS INHIBITION BY CARNATION SAP

The magnitude of virus inhibition appeared to be independent of the length of time during which virus and inhibitor remained in contact *in vitro* (table 10). In Chapter II it has been pointed out already that no proportionality was found between virus and inhibitor for complete inhibition of virus infection. Therefore, any kind of interaction in vitro seemed to be improbable.

The independent existence of virus and inhibitor in mixtures could be confirmed by ultracentrifugation of sap of mosaic-infected carnation plants. After 2 hrs. ultracentrifugation at 113,380 *g*, the resulting pellet proved to contain active virus, as was shown when dissolved in the original volume of buffer solution (pH 5.4) and tested on French bean. On three primary leaves 573 local lesions were counted, against 1 on the control leaves inoculated with the starting carnation sap. The virus-inhibiting power of the supernatant fluid determined against T.M.V. on *Nicotiana glutinosa* was unchanged as compared with the original sap. Resulting from these experiments, and from the fact that differences in sensitivity to the inhibitory action between various plant species exist, it is assumed that the inhibitor acts through its effect on the host plant.

In fact, separate applications of virus and inhibitor to detached leaves of *Nicotiana glutinosa* resulted in a distinct effect on the infection. This was found by applying the inhibitor before or after inoculating the leaves. A preventive treatment by dipping half leaves for a moment in carnation sap, with subsequent rinsing in tap water, protected these leaves against infection with T.M.V. for more than three hours. In an experiment with time intervals between dipping and inoculation of 1, 2 and 3 hrs. we found the following mean numbers of local lesions, each calculated from counts on 10 half leaves: 1/54, 2/38, and 3/35, respectively. The denominators show the mean numbers of lesions counted on the control halves which had been dipped in water. Another experiment with intervals of 1 and 2 hrs. resulted in 3/164 and 6/156 mean counts respectively.

The results of applying the inhibitor after inoculation are shown in table 12 and figure 3. By comparing the data in table 12 obtained by using young and old leaves it is evident that the degree of inhibitory action is much less on older leaves than on young ones. There is also another difference between young and old leaves, viz. young leaves show a maximal effect when the period of dipping in carnation sap is extended to 5 min., whereas with older leaves a short dip of a few seconds is enough to be most effective.

The infectivity of ribonucleic acid (R.N.A.) isolated according to GIERER & SCHRAMM (1956) from a purified T.M.V. preparation containing 7.9 mg virus/ml was inhibited by the substance from carnation to the same degree as complete T.M.V. Inhibition was found to occur if mixtures of R.N.A. and partially purified inhibitor were inoculated on *Nicotiana glutinosa*, as well as if the inhibitor had been applied to leaves before inoculation (table 13). In the R.N.A. preparation no complete rigid rod-shaped T.M.V. particles could be detected in

electron-micrographs of which an example is given in photograph 4. Colour tests did not reveal the presence of protein in the R.N.A. preparations whereas the phenol phase used to split off the protein coat was strongly protein positive, as was also untreated T.M.V. The results of the experiments with R.N.A. and inhibitor present new evidence that the mechanism of inhibition is not the result of an interaction between inhibitor and protein coat of the virus.

Finally a reaction mechanism is proposed interpreting the inhibitory activity as blocking some essential positions near the leaf surface. This is suggested by the fact that the inhibitor acts strongly when the leaves are dipped during a very short time in carnation sap before inoculation. It can hardly be explained by supposing the inhibitor immediately enters the cells. Moreover the after treatment of inoculated leaves is effective only during a short time. This phenomenon cannot be explained merely suggesting that penetration of cells is becoming impossible since wounds are healing, BAWDEN & HARRISON (1955). In this respect JEDLINSKY (1956) stated that in several virus-testplant combinations, infection of dry-wounded leaves by dipping in virus solutions increased, within a time interval of 10 min. between wounding and dipping.

Following the ultracentrifugation experiment with sap from mosaic-diseased carnation plants, the precipitation of the inhibitor by prolonged centrifugation was attempted. Centrifugation of healthy carnation sap for 8 hrs. at 254,500 *g* in the analytical cell of a Spinco E ultracentrifuge did result in sedimentation of the active compound. This was detected by testing successive fractions of supernatant fluid against T.M.V. on *Nicotiana glutinosa*. A direct record of the sedimentation phenomenon by the Schlieren optical system failed as inhibitor concentration seemed to be too low. The results of a typical experiment have been listed below, recording the activity percentages from mixtures containing equal volumes of the different solutions (or dilutions) and a T.M.V. preparation with 33 γ virus/ml (six leaves per series).

Solutions tested	Activity percentages		
	Undiluted	Diluted 10^{-1}	Diluted 10^{-2}
starting carnation sap	0.0	17.5	57.7
fraction 1 (0.219 ml)	100	–	–
fraction 2 (0.154 ml)	57.1	–	–
fraction 3 (0.192 ml)	1.0	–	–
fraction 4 (0.198 ml)	0.0	6.2	31.5
pellet suspended in 0.8 ml 1% NaCl solution	85.5	100	–

From these data a sedimentation constant (s) of 1.4 could be calculated for the inhibitor. This indicates a molecular weight of at least 10,000 (see also fig. 1, graph 2 and fig. 2).

CHAPTER IV

ISOLATION AND PROPERTIES OF THE INHIBITOR IN CARNATION SAP

According to its molecular weight the inhibitor could not be dialysed in cellophane tubing without loss. It was also, thermolabile, as heating carnation sap above 80°C destroyed inhibitor activity (VAN DER WANT personal communication). The inhibitor dissolved only in watery solvents. When dried it was hardly dissolving at all.

The isolation of the inhibitor was tried along two different lines. As was demonstrated in chapter III the inhibitor was displaced in solutions applying large centrifugal forces. Therefore an attempt was made by employing preparative ultracentrifugation. A diagrammatic representation of successive treatments and resulting fluids is given in scheme 1. Table 14 shows the inhibitor distribution over the different solutions. In preliminary experiments it was revealed that the inhibitor could be precipitated largely from solutions by adding $(NH_4)_2SO_4$ to a degree of 50% saturation (table 11). An isolation experiment based upon these method is represented in scheme 2 and table 16. In solution $A._{2\cdot 2}$. an absolute concentration of the inhibitor has been attained, further the concentration is relatively only.

Some of the solutions were examined in the ultracentrifuge using an analytical rotor. From those which were transmissible to the light of the Hg-lamp, sedimentation diagrams are represented in photograph 5. The slowest sedimenting compound, which was dark coloured, had a sedimentation constant resembling that of the inhibitor in some cases (table 16).

Further purification was performed by open strip electrophoresis, used as semimicro preparative method. In this way colourless water clear solutions were obtained with pronounced virus-inhibiting properties. After electrophoresis at 0°C about 10% of the originally applied inhibitor activity could be detected in the extracts. At pH values of 5.4 and 8.1 decrease of inhibitor activity was more pronounced. When examined spectrophotometrically, extracts of inhibitor-containing zones from electropherograms did not reveal an absorption maximum in the ultra violet region (fig. 4). The inhibitor behaves as an uncharged compound at voltages of 100–360 V and at pH values ranging from 5.4–8.1 (photograph 6). It also appears to be uncharged when borate buffers are applied. This last indicates that the inhibitor does not contain a sugar as integral part of its molecule. Paperchromatography of unhydrolysed extracts of the zones containing the active compound revealed besides some free (neutral) aminoacids and sugars, a protein-compound. This could not yet be identified with the inhibitor, as adjacent zones without inhibitor activity also proved to contain proteinaceous material.

CHAPTER V

CRITICAL REVIEW OF LITERATURE CONCERNING NATURALLY OCCURRING PLANT-VIRUS INHIBITORS, THEIR CHARACTER AND MODE OF ACTION

The following inhibitors which have been more or less defined, purified and characterized are taken into consideration:

1. Inhibitors from *Spinacea oleracea* (KUNTZ & WALKER, 1947);
2. An inhibitor from *Phytolacca esculenta* (KASSANIS & KLECZKOWSKI, 1948);
3. An inhibitor from *Dianthus barbatus* (WEINTRAUB & GILPATRICK, 1952);
4. An inhibitor from *Tetragonia expansa* (BENDA, 1956);
5. Inhibitors from culture media of *Trichothecium roseum* (BAWDEN & FREEMAN, 1952);
6. An inhibitor from culture media of *Neurospora* spec. (SLAGLE et al., 1952);
7. An inhibitor from baker's or brewer's yeast (TAKAHASHI, 1942, 1946).

Isolation methods, chemical and physical properties, and activities *in vitro* and *in vivo* were summerized. Out of seven high-molecular (not dialysable) inhibitors indicated above, only three were isolated in a pure state, viz. no. 4 defined as glycoprotein, nos. 5 and 7 as polysaccharides. Of these only the inhibitor studied by TAKAHASHI (1946) was proved to be homogeneous. The high molecular inhibitors were either thermolabile (nos. 1–4) or thermostable (nos. 5–7).

The different interpretations regarding the mechanism of virus-inhibition stated by the authors concerned will be summed up and discussed below. The literature on the infection phenomenon is also analysed as virus inhibition in some respect is closely related to it. To support a personal view investigations carried out by others than the above mentioned authors will be considered as well.

KUNTZ & WALKER (1947) concluded that nothing throughout their investigation indicated that the inhibitory action was due to modifications of the inoculated host plant. According to the authors it is rather indicated that distinct chemical substances present in extracts of spinach and other chenopodiaceous plants render the virus noninfective. However it is not clear how these authors argue this, since virus activity in inhibitor-containing solutions is easily restored by adsorbing the inhibitor to activated coal or by precipitating it with alcohol to a final concentration of 50 %.

KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948) suppose from a.o. visible complex formation that the simplest explanation of the virus inhibiting action of the *Phytolacca* inhibitor would be the blocking of some groups on the virus which are essential for the establishment of infection. However, the authors do not assume that the combination of virus and inhibitor is really essential for the inhibition as a mere combination with protein (e.g. clupein and globin) does not result in virus inhibition and moreover since no fixed neutralizing ratio for complete inactivation exists.

Weintraub & Gilpatrick (1952) also did not succeed in giving a definite conclusion as to whether the inhibitor acted directly on the virus or on the host (in contrast to what Bawden, 1954, p. 43 writes). In the authors' opinion the only tests that could be interpreted in favour of an action on the virus were those in which separate application of inhibitor and virus resulted in complete absence of inhibition. As those tests did not allow to distinguish between a qualitative and a quantitative effect, it is not certain whether the inhibitor from sweet William really differs from the inhibitor of carnation in this respect.

From their experiments with T.M.V., bushy stunt virus and tobacco necrosis virus using *Nicotiana glutinosa*, and beans Bawden & Freeman (1952) assume almost as a fact that inhibitors act directly on the host plants. This would be implied by the fact that relative efficiency of different inhibitors is determined by the species of the host plant and not by the identity of the virus. Discussing the mode of affecting the host plant Bawden & Freeman distinguish between two mechanisms. They introduce first by analogy with phenomena from the field of bacterial viruses the idea of virus receptor in plant virology. Thung (1952) had indicated before the fitting in of virus into the host protoplasm as „attachment process". Inhibitors might act according to Bawden & Freeman by blocking these receptors. Since substances with widely different compositions can operate as inhibitors the authors abandon their own postulate immediately. Instead they are more inclined to accept another type of mechanism, viz. that inhibitors alter the physiology of the host cells in such a way that the cells no longer support virusmultiplication. No other properties are required than that inhibitors differ from normal components of cells and because of this stimulate the cells to some unusual activity. According to the authors this sufficiently explains the fact that extracts from leaves of some plants prevent infection of some other species but not of themselves (Bhargava, 1951; van der Want, 1951). Investigations by the present author proved that the inhibitor from carnation at such a concentration as occurs in original sap, does not protect several species other than carnation from infection. On the other hand carnation itself could be protected to some degree at appropriate inhibitor concentrations. Moreover, it seems to us that the objection against the idea that inhibitors which are so widely dissimilar in composition all cause the same blocking effect also applies to the hypothesis that they act by changing the physiology of host cells in a specific manner.

Benda (1956), interpreting the mode of action of the inhibitor from *Tetragonia expansa* used Bawden's hypothesis of virus inhibition. He supposed that the action of the inhibitor makes cells unsuitable for the welfare of the virus and that the longer the period required for the inhibiting activity to „wear off" the less virus would remain active. However from infiltration experiments with marked T.M.V. (C^{14}, P^{32}) Jeener & van Rijsselberge (1955) concluded that even normal cells after penetration of complete virus did not support virus multiplication too.

Because of visible damage to leaves inoculated with solutions containing the inhibitor produced by *Neurospora*, Slagle et al. (1952) decided that the inhibitor acts by killing cells which could serve as entry points for virus. In so far as visible damage is caused by an inhibitor we agree with the authors' opinion. We do not agree with the hypothesis they advance that all kind of inhibitors act in this way.

BAWDEN (1954) defined two types of inhibitors, viz. inhibitors of infection and inhibitors of virus increase. However, in the same paper (p. 55) he writes: „...although the phenomena of inhibition of infection and inhibition of virus increase look very dissimilar... there may be no fundamental differences".

In our opinion such differences do exist. New developments in the concepts regarding as well the infective principle of T.M.V. (GIERER & SCHRAMM, 1956) as virus synthesis in plants (VAN RIJSSELBERGE & JEENER, (1955), and results of infiltration experiments acquired by JEENER & VAN RIJSSELBERGE (1955) may lead to the hypothesis that the removal of the protein coat from the virus is an essential step in the infection process. Then there would exist a complete analogy with the phenomenon of infection of bacteria by bacteriophage (HERSHEY & CHASE, 1952). A logical continuation of this hypothesis would be the assumption that virus receptors also occur in plant cells. This idea is supported by the finding that receptor function and the property of causing protrusion of the nucleic acid component from T_5 phage are localized in one single, well defined compound present in the cellwall of *Escherichia coli* strain B (WEIDEL, KOCH & BOBOSCH, 1954; WEIDEL & KELLENBERGER, 1955). Moreover JEENER & VAN RIJSSELBERGE (1955) suppose that the membrane of epidermal cells might contain an activating substance capable of liberating the ribonucleic acid from „inactive" (read: complete) virus, whereas parenchymous cells would miss this substance.

If the action of virus inhibitors is explained in certain cases as a blocking of receptors, it is still conceivable that various types of substances can have this effect as a consequence of a reaction between the substances involved and the structures neighbouring the receptor proper („steric hindrance"). These substances may be quite different in composition without having any relation to certain components of complete virus. On the other hand it is imaginable that competitive inhibitors exist, i.e. inhibitors which share the property of viruses to react with the receptor itself.

Besides inhibitors acting by steric hindrance or competitive action, undoubtedly there will be others which act by affecting the mechanism of virus multiplication. Because common cell processes are involved, these latter inhibitors may cause damage to the host.

LITERATUUR

BARTELS, W., 1955. Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der Inaktivierung pflanzenpathogener Viren, ins besondere des Tabakmosaikvirus. Phytopath. Zeitschr. 24: 117–178.

BAWDEN, F. C. & A. KLECZKOWSKI, 1945. Proteinprecipitation and virus inactivation by extracts of strawberry plants. J. Pom. Horticultural Science. 21: 2–7.

BAWDEN, F. C. & G. C. FREEMAN, 1952. The nature and behaviour of inhibitors of plant viruses produced by Trichothecium roseum Link. J. gen. Microbiol. 7: 154–168.

BAWDEN, F. C., 1954. Advances in virus research, vol. II: 31–57, Acad. Press Inc. N.Y.

BAWDEN, F. C. & B. D. HARRISON, 1955. Studies on the multiplication of a tobacco necrosis virus in inoculated leaves of French-bean plants, J. gen. Microbiol. 13: 494–508.

BENARD, A. & CONSTANCE VAN EEDEN, 1956. Handleiding voor de symmetrietoets van Wilcoxon, Rapport S 208 (M 76), Mathematisch Centrum, Amsterdam.

BENDA, G. T. A., 1956. The effect of New Zealand spinach juice on the infection of cowpeas by Tobacco ringspot virus. Virology 2: 438–454.

BENDA, G. T. A., 1956(a). Infection of Nicotiana glutinosa L. following injections of two strains of tobacco mosaic virus into a single cell. Virology 2: 820–827.

CONSDEN, R. & A. H. GORDON, 1948. Effect of salt on partition chromatograms. Nature 162: 180–181.

CORNUET, P., C. MARTIN & P. LIMASSET, 1950. Extraction du virus de la mosaïque du Dahlia (Marmor Dahliae Holmes) à partir de Dahlias infectés et obtention de son antiserum. C.R. Séances Acad. Scien. 231: 913–941.

DURRUM, E. L., 1950. A microelectrophoretic and microionophoretic technique. J. Am. Chem. Soc. 72: 2943–2948.

FREEMAN, G. G. & J. E. GILL, 1950. Alkaline hydrolysis of Trichothecin. Nature 166:698–699.

FULTON, R. W., 1941. The behaviour of certain viruses in plant roots. Phytopath. 31: 575–598.

GAILLARD, B. D. E., 1954. Chromatografisch onderzoek naar de samenstelling van de polysacchariden uit de celwand in verband met de analyse van ruwvoeders. Med. Landb. Hogeschool, Wageningen (Ned.). 54 (4): 115–179.

GENDRON, Y. & B. KASSANIS, 1954. The importance of the host species in determining the action of virus inhibitors. Ann. appl. Biol. 41: 183–188.

GIERER, A. & G. SCHRAMM, 1956. Die Infeksiosität der Nucleinsäure aus Tabaksmosaikvirus. Z. Naturforch. 11b: 138–142.

HERSHEY, A. D. & M. CHASE, 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. gen. Physiol. 36: 39–56.

HOLMES, F. O., 1929. Inoculating methods in tobacco mosaic studies. Bot. Gaz. 87: 56–63.

JEDLINSKI, H., 1956. Plant virus infection in relation to the interval between wounding and inoculation. Phytopath. 46: 673–676.

JEENER, R., & C. VAN RIJSSELBERGE, 1955. Un essai d'infection directe des cellules du parenchyme de la feuille de tabac à l'aide de virus de la mosaïque marqué par le C^{14} et le P^{32} sort du virus. Biochim. Biophys. Acta 17: 233–239.

KASSANIS, B. & A. KLECZKOWSKI, 1948. The isolation and some properties of a virus-inhibiting protein from Phytolacca esculenta. J. Gen. Microbiol. 2: 143–153.

KUNTZ, J. E. & J. C. WALKER, 1947. Virus inhibition by extracts of spinach. Phytopath. 37: 561–579.

MANIL, P., 1949. Inhibition de virus phytopathogènes par des extraits de plantes. Compt. Rend. Soc. Biol. Paris. 143: 101–105.

NEILANDS, J. B. & P. K. STUMPF, 1955. Outlines of enzyme chemistry. John Wiley & Sons, Inc. New York.

NEURATH, N. & K. BAILY, 1953. The proteins Vol. 1A. Academie Press Inc., New York.

NOORDAM, D., T. H. THUNG & J. P. H. VAN DER WANT, 1951. Onderzoekingen over anjermozaiek I. T. Pl.ziekten 57: 1–15.

RIJSSELBERGE, C. VAN & R. JEENER, 1955. The role of the soluble antigens in the multiplication of the tobacco mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta. 17: 158–159.

Ross, A. F., 1941. Purification and properties of alfalfamosaic virus protein. Phytopath. 31: 394–410.
Sevag, M. G., D. B. Lackman & J. Smolens, 1938. The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form. J. biol. Chem. 124: 425.
Shepard, C. C. & A. V. Tiselius, 1949. The chromatography of proteins. The effect of salt concentration and pH on the adsorption of proteins to silica gel. Discuss. Faraday Soc. 7: 275–285.
Slagle, C. W., S Wolcyrz & W. C. Price, 1952. Inhibition of plant virus infection by growth products of Neurospora. Phytopath. 42: 240–244.
Takahashi, W. N., 1942. A virus inactivator from yeast. Science 95: 586–587.
Takahashi, W. N., 1946. Properties of a virus inactivator from yeast. Science. 104: 377.
Thung, T. H., 1952. The infectivity of viruses. Proc. Conf. Potato Virus Diseases. Wageningen-Lisse, 1951: 76–78.
Tiselius, A., 1949. Adsorption separation by salting out. Arkiv Kemi, Min., Geol. 26 B. N: O 1.
Want, J. P. H. van der, 1951. Onderzoekingen over anjermozaiek II. T.Pl.ziekten. 57: 72–74.
Want, J. P. H. van der, 1953. The in vitro separation of viruses from mixtures containing virus inhibitors from carnation plants. Estratto dagli Atti del VI Congresso Intern. Di Microbiol. Roma 1953, Vol. 3, Sez. IX: 394–398.
Weidel, W., G. Koch & K. Bobosch, 1954. Ueber die Rezeptorsubstanz für den Phagen T 5. I. Extraktion und Reindarstellung aus E. coli B. Physikalische chemische und funktionelle Charackterisierung. Z. Naturforschg. 9b: 573–579.
Weidel, W. & E. Kellenberger, 1955. The E. Coli B-receptor for the phage T5. II. Electron microscopic studies, Biochim. Biophys. Acta 17: 1–9.
Weintraub, M. & J. D. Gilpatrick, 1952. An inhibitor in a new host of tobacco ring spot virus. Can. J. Bot. 30: 549–557.
Yarwood, C. E., 1952. The phosphate effect in plant virus inoculations. Phytopath. 42: 137–143.
Yarwood, C. E., 1952(a). Deleterious action of water in plant virus inoculations. Nature 169: 502.

ADDENDUM I.

Symptomen veroorzaakt door enige der gebezigde virussen op enkele nieuwe of weinig bekende toetsplanten.

Symptomes on some new or little known host plants caused by several of the viruses used.

Virus *Virus*	Waardplant *Host plant*	Opkomst symptomen na: *Appearance of symptomes after:*	Aard van de lokale reactie *Type of local reaction*
A.M.V.	Chenopodium quinoa [1])	3 dagen *days*	stipvormige necrotische vlekjes *very small necrotic spots*
A.M.V.	Phytolacca esculenta [2])	2–3 dagen *days*	kleine ronde en ringvormige vlekjes *small necrotic spots and rings*
A.M.V.	Cucumis sativus	3–5 dagen *days*	vrij vage lichtgroene ringen op cotylen *on cotyledons rather faint light green spots*
R.V.	Chenopodium quinoa [1])	2–3 dagen *days*	onregelmatige grijze ingezonken vlekken Ø 1,5–2 mm *irregular grayish sunken spots Ø 1.5–2 mm*
R.V.	Phytolacca esculenta [2])	2 dagen *days*	overwegend ringvormige necrotische vlekken van ca. 1,5 mm, na 6–7 dagen ook grovere secundaire necrotische vlekken *predominantly necrotic rings of c. 1.5 mm, after 6–7 days also larger secondary necrotic spots*
R.S.V.	Chenopodium quinoa [1])	3–5 dagen *days*	kleine ronde necrotische vlekjes van ca. 1 mm *small necrotic spots of about 1 mm*
B.S.V.	Chenopodium quinoa [1])	5 dagen *days*	onregelmatige necrotische vlekjes van ca. 1–2 mm *irregular necrotic spots of about 1–2 mm*
B.S.V.	Gomphrena globosa	3 dagen *days*	kleine bruine vlekjes *small brown spots*
S.K.V.	Chenopodium quinoa [1])	8–10 dagen *days*	ringvormige en ronde gele vlekken van 1–3 mm *yellow spots and rings of 1–3 mm*
S.K.V.	Amaranthus retroflexus [1])	6–8 dagen *days*	roodbruine vlekken, later necrotisch wordend *red-brown spots, becoming necrotic*
S.K.V.	Helianthus annuus	10 dagen *days*	een enkele grove necrotische vlek op de geïnoculeerde cotylen, vage geelgroene of necrotische systemische vlekken in de gewone bladeren *single necrotic spot on inoculated cotyledons, faint yellowish green or necrotic systemic spots in common leaves*

[1]) Gebruikt werden jonge volgroeide bladeren.
Young mature leaves have been used.

[2]) In het algemeen geven slechts jonge, juist volgroeide bladeren, waarvan het oppervlak nog glimmend en enigszins gebobbeld is, symptomen.
Clear symptomes are only given by young mature leaves with a somewhat shiny surface. These leaves are not yet completely smooth.

Addendum II

Gemiddeld aantal vlekken per blad (bladhelft). Teller: virus-anjersap mengsels, noemer: virus-H_2O mengsels.
Mean number of local lesions per leaf (half leaf). Virus-carnation sap mixtures/Virus-H_2O mixtures.

1. Gegevens behorende bij tabel 6.
   Data from experiments belonging to table 6.

Toestplanten / *Testplants*	Virus / *Virus*	Onverdund*) *undiluted**)	Onverdund *undiluted*	Verdund 10^{-1} *diluted* 10^{-1}	Verdund 10^{-2} *diluted* 10^{-2}	Aantal bladeren (bladhelften) per serie *Number of leaves (half leaves) in each series*
A.M.V.						
Chenopodium quinoa		–	145/248	63/145	25/69	6 bladhelften *half leaves*
Phytolacca esculenta		–	241/215	62/128	–	5 bladhelften *half leaves*
Gomphrena globosa		–	19/28	4/17	–	5 bladeren *leaves*
Phaseolus vulgaris		–	3/2104	0/992	0/107	4 bladeren *primary leaves*
Nicotiana tabacum		0/7	0/3	0/2	–	5 bladhelften *half leaves*
Cucumis sativus		13/204	1/132	1/126	0/83	8 cotylen *cotyledons*
Callistephus chinensis		11/122	2/122	0/22	–	10 bladeren *leaves*
B.S.V.						
Chenopodium quinoa		–	189/192	87/269	21/97	7 bladhelften *half leaves*
Gomphrena globosa		–	95/115	38/97	10/33	6 bladeren *leaves*
Vigna sinensis		1/147	0/110	0/9	0/5	6 bladeren *primary leaves*
Nicotiana tabacum		8/489	0/418	0/362	0/77	6 bladhelften *half leaves*
Nicotiana glutinosa		74/372	12/580	1/358	0/92	6 bladhelften *half leaves*
Cucumis sativus		8/98	1/91	0/131	0/40	7 cotylen *cotyledons*
R.S.V.						
Chenopodium quinoa		–	684/1360	473/1084	43/608	6 bladhelften *half leaves*
Phytolacca esculenta		–	63/73	–	–	6 bladhelften *half leaves*
Gomphrena globosa		–	80/144	20/73	4/15	5 bladeren *leaves*
Phaseolus vulgaris		331/1884	67/2075	7/1052	1/378	4 bladeren *primary leaves*
Vicia faba		18/57	1/23	0/24	–	8 blaadjes *leaflets*
Vigna sinensis		–	46/301	2/202	–	6 bladeren *primary leaves*
Nicotiana tabacum		121/882	10/1059	1/578	0/68	5 bladhelften *half leaves*
Antirrhinum majus		44/627	1/535	0/360	0/49	6 bladeren *leaves*
Cucumis sativus		60/179	13/151	3/153	0/28	8 cotylen *cotyledons*
R.V.						
Chenopodium quinoa		–	35/85	26/72	–	6 bladhelften *half leaves*
Phytolacca esculenta		–	84/133	39/50	3/46	6 bladhelften *half leaves*
Gomphrena globosa		–	2/4	1/2	–	5 bladeren *leaves*
Nicotiana tabacum		29/275	1/392	0/313	0/49	5 bladhelften *half leaves*
Nicotiana glutinosa		6/238	1/214	–	–	5 bladhelften *half leaves*
Cucumis sativus		4/20	0/12	0/14	0/4	8 cotylen *cotyledons*
S.K.V.						
Chenopodium quinoa		134/113	44/107	2/9	0/4	8 bladhelften *half leaves*
Gomphrena globosa		30/29	6/37	0/1	–	8 bladeren *leaves*
Amaranthus retroflexus		45/49	8/69	0/28	–	8 bladhelften *half leaves*
Nicotiana tabacum		7/633	0/599	0/144	0/17	6 bladhelften *half leaves*

*) Anjersap was 10^{-1} verdund met H_2O.
Carnation sap 10^{-1} diluted with H_2O.

2. Gegevens behorende bij tabel 7.
Data from experiments belonging to table 7.

	Anjersap-*Carnation sap*		
	Onverdund *Undiluted*	Verdund 10^{-1} *Diluted* 10^{-1}	Verdund 10^{-2} *Diluted* 10^{-2}
T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* (6 bladhelften per serie) *T.M.V. on Nicotiana glutinosa (6 half leaves in each series)*			
330 γ/ml	0/264	18/301	209/366
33 γ/ml	0/202	3/152	45/193
3,3 γ/ml	0/124	1/89	8/108
S.K.V. op *Nicotiana tabacum* (6 bladhelften per serie) *S.K.V. on Nicotiana tabacum (6 half leaves in each series)*			
Onverdund - *Undiluted*	0/488	2/470	89/430
Verdund 10^{-1} - *Diluted* 10^{-1}	0/112	0/74	14/16
Verdund 10^{-2} - *Diluted* 10^{-2}	0/13	0/7	1/2
T.N.V. op *Nicotiana tabacum* (6 bladhelften per serie) *T.N.V. on Nicotiana tabacum (6 half leaves in each series)*			
Onverdund - *Undiluted*	12/1055	154/1004	–
Verdund 10^{-1} - *Diluted* 10^{-1}	0/905	173/1119	–
Verdund 10^{-2} - *Diluted* 10^{-2}	–	34/445	342/662
A.M.V. op *Cucumis sativus* (7 cotylen per serie) *A.M.V. on Cucumis sativus (7 cotyledons in each series)*			
Onverdund - *Undiluted*	2/68	6/44	
Verdund 10^{-1} - *Diluted* 10^{-1}	0/79	7/44	
Verdund 10^{-2} - *Diluted* 10^{-2}	0/23	–	

De mengsels 10 ^{1} verdund virus–10^{-1} verdund anjersap vergeleken met overeenkomstige virus–H_2O mengsels, gaven voor R.S.V. op *Antirrhinum majus* en B.S.V. op *Cucumis sativus* als quotiënt der gemiddelde aantallen vlekken respectievelijk 10/254 en 1/70.
Ratio of mean numbers of local lesions for: (10^{-1} *diluted virus-containing sap +* 10^{-1} *diluted carnation sap) / (*10^{-1} *diluted virus containing sap + water) inoculating R.S.V. on Antirrhinum majus 10/254; B.S.V. on Cucumis sativus 1/70.*

3. Gegevens behorende bij tabel 8 – *Data from experiments belonging to table 8*

Toetsplant *Test plant*	Virus *Virus*	Onverdund *Undiluted*	Verdund 10 [1] *Diluted 10⁻¹*	Verdund 10^{-2} *Diluted 10⁻²*	Anjersap *Carnation sap*	Aantal bladeren (bladhelften) per serie *Number of leaves (half leaves) in each series*
Chenopodium quinoa	A.M.V.	85/394	–	–	a g*)	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	,,	301/387	–	–	a o*)	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	R.V.	2/103	0/101	0/57	a g	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	,,	17/80	5/90	1/25	a o	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	R.S.V.	50/1685	10/1670	4/645	a g	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	,,	1147/1934	848/1280	207/651	a o	6 bladhelften *half leaves*
Phytolacca esculenta	A.M.V.	4/149	2/80	–	a g	7 bladhelften *half leaves*
,, ,,	,,	58/195	12/70	–	a o	7 bladhelften *half leaves*
,, ,,	R.V.	12/136	6/31	0,5/18	a g	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	,,	118/90	37/58	9/14	a o	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	R.S.V.	10/37	–	–	a g	6 bladhelften *half leaves*
,, ,,	,,	88/110	61/54	–	a o	6 bladhelften *half leaves*
Gomphrena globosa	,,	34/143	1/107	0/11	a g	5 bladeren *leaves*
,, ,,	,,	78/154	52/93	4/14	a o	5 bladeren *leaves*
Dianthus caryophyllus	A.M.V.	$^{2}/_{8}\|^{8}/_{8}$* $^{8}/_{8}\|^{8}/_{8}$**	$^{1}/_{8}\|^{6}/_{8}$* $^{4}/_{8}\|^{8}/_{8}$**	$^{0}/_{8}\|^{5}/_{8}$* $^{1}/_{8}\|^{8}/_{8}$**	a g	8 planten *plants*
,, ,,	,,	$^{4}/_{8}\|^{8}/_{8}$* $^{8}/_{8}\|^{8}/_{8}$**	$^{3}/_{8}\|^{6}/_{8}$* $^{5}/_{8}\|^{8}/_{8}$**	$^{0}/_{8}\|^{5}/_{8}$* $^{3}/_{8}\|^{8}/_{8}$**	a o	8 planten *plants*

x) a g = geconcentreerd anjersap
a o = onbehandeld anjersap.
*) Resultaten 9 dagen na inoculatie.
**) Resultaten 23 dagen na inoculatie; 38 dagen na inoculatie nog ditzelfde beeld.

a g = *concentrated carnation sap.*
a o = *untreated sap.*
9 days after inoculation.
23 days after inoculation. The same result still was observed at the end of the experiment, i.e. 38 days after inoculation.

FOTO 1. Bladeren van White Burley tabak op 12-4-'57 geïnoculeerd: linker helften met sap van petunia besmet met S.K.V. + water; rechter helften idem + anjersap 10^{-1} verdund (gemengd werden gelijke volumina).
Foto genomen op 16-4-'57.

Photogr. 1. Leaves of White Burley tobacco inoculated on 12-4-'57: left halves with sap from petunia infected with S.K.V. + water (equal volumes); right halves do + carnation sap 10^{-1} diluted (equal volumes).
Photograph made on 16-4-'57.

Foto 2. Tomateplanten op 16-11-'56 geïnoculeerd met:
rij 1 een mengsel van gelijke volumina onverdund sap van tomaat besmet met bushy stunt virus en onverdund anjersap.
rij 2 idem onverdund virushoudend sap en water.
rij 3 idem 10^{-1} verdund virushoudend sap en onverdund anjersap.
rij 4 idem 10^{-1} verdund virushoudend sap en water.
Foto genomen op 22-12-'56.

Photogr. 2. Tomato plants inoculated on 16-11-'56 with:
row 1 a mixture of equal volumes of undiluted sap from tomato plants infected with bushy stunt virus and undiluted carnation sap.
row 2 do undiluted virus-containing sap and water.
row 3 do 10^{-1} diluted virus-containing sap and undiluted carnation sap.
row 4 do 10^{-1} diluted virus-containing sap and water.
Photograph made on 22-12-'56.

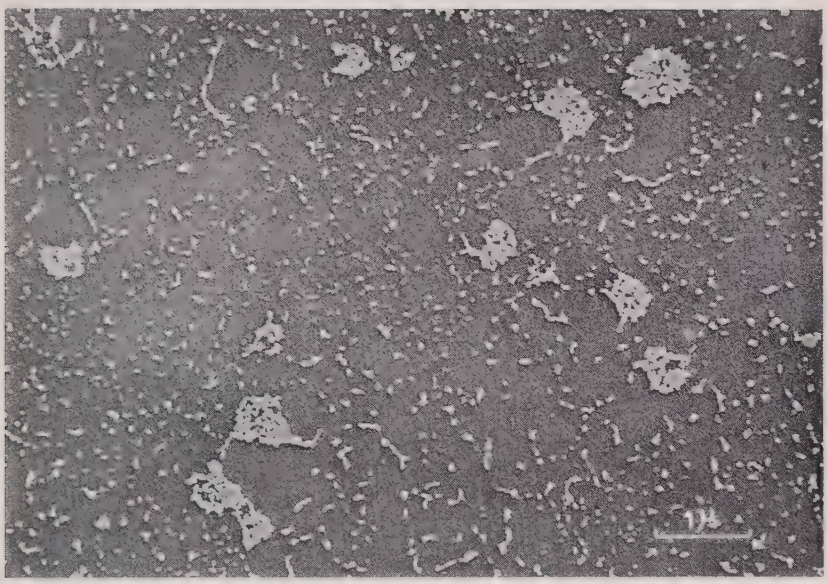


Foto 3. Anjermozaiekvirus van natuurlijk besmette anjers uit de volle grond. Viruspreparaat verkregen door ultracentrifugering bij 113.000 *g* gedurende 2 h, gevolgd door centrifugering van het in fosfaatbuffer pH 5,4 opgenomen sediment bij ca. 6000 *g* gedurende 10 min. Beide bewerkingen tweemaal herhaald.
Vergroting 13.600 ×.

Photogr. 3 *Carnation mosaic virus from naturally infected open grown carnation plants. Virus solution prepared by two successive runs of alternating high and low speed centrifugation (2 hrs. at 113,000 g and 10 min. at c. 6000 g respectively). Sediment dissolved in phosphate buffer pH 5.4.*
Magnification 13,600 ×.

A B

FOTO 4. Elektronenmicroscopische opnamen van ribonucleïnezuur bereid uit geconcentreerd, gezuiverd tabaksmozaiekvirus, volgens de methode van GIERER & SCHRAMM (1956).
A. overzichtsfoto, vergroting 6.000 ×; B. detail van A., vergroting 27.000 ×. Het nucleïnezuur doet zich ten dele als een draderige massa voor. Let op het ontbreken van intacte (staafvormige) virusdeeltjes.
Opnamen vervaardigd door Mej. Dra. C. VAN DER SCHEER en de Heer S. HENSTRA, Landbouw Fysisch Technische Dienst, Wageningen.

Photogr. 4. Electron micrograms of ribonucleic acid prepared from concentrated, purified tobacco mosaic virus according to Gierer & Schramm (1956).
A. a droplet pattern, magnification 6,000 ×; B. detail from A, magnification 27,000 ×. Note the partly thread-like appearance of nucleic acid and the complete lack of intact (rod-shaped) virus particles.
Micrograms made by Miss Dra. C. van der Scheer and Mr. S. Henstra, Landbouw Fysisch Technische Dienst, Wageningen.

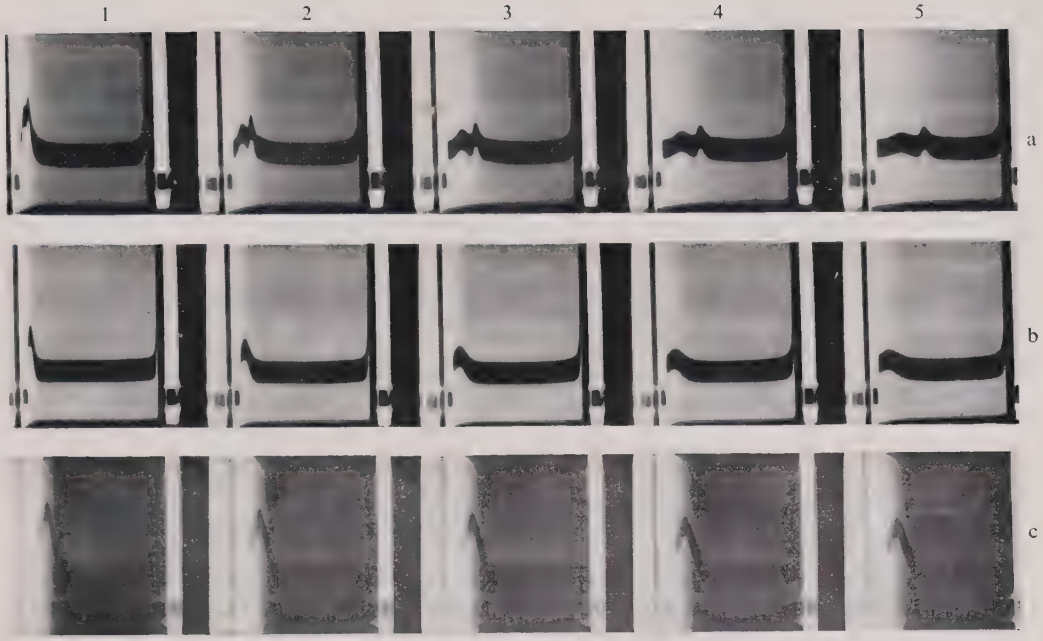


Foto 5.
Sedimentatiediagrammen verkregen door ultracentrifugering van de onderstaande vloeistoffen bij 254.000 *g*. Tussen de opeenvolgende opnamen ligt steeds een tijdsinterval van 4 minuten.
Serie a verkregen met oplossing $a_{1\cdot 1}$*) ; opname a(1) gemaakt 8 min. na het bereiken van het vereiste toerental.
Serie b verkregen met oplossing B_3*) ; opname b(1) gemaakt 1 min. na idem.
Serie c verkregen met oplossing xy_1Z_2**); opname c(1) gemaakt 22 min. na idem.
*) zie schema 1. **) zie schema 2.

Photogr. 5.
Sedimentation diagrams obtained by ultracentrifugation at 254,000 g. Successive photographs have been made with time intervals of 4 minutes.

Series a obtained with solution $a_{1\cdot 1}$.*) *; photograph a(1) made 8 min. after coming to speed.*
Series b obtained with solution B_3*) *; photograph b(1) made 1 min. after etc.*
Series c obtained with solution xy_1Z_2**) *; photograph c(1) made 22 min. after etc.*
**) see scheme 1. **) see scheme 2.*

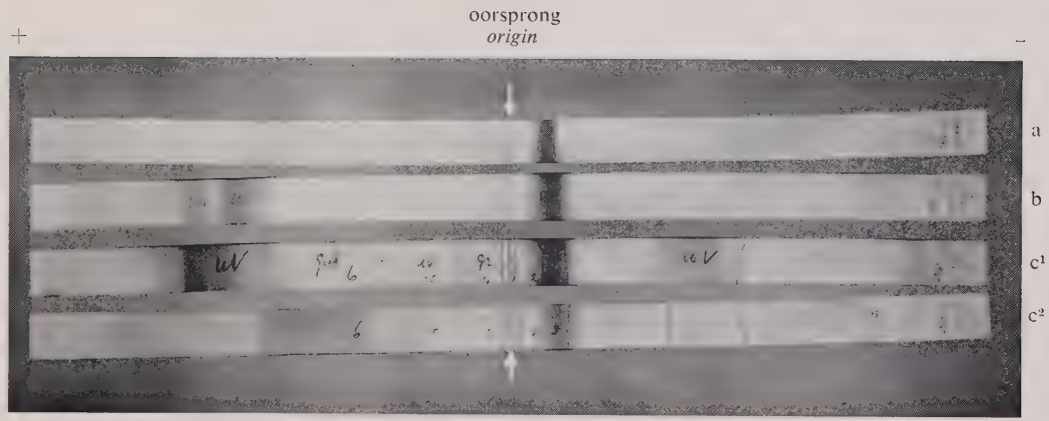


Foto 6.
Elektroferogrammen van:
a. glucose, opgebracht 125 γ.
b. een aminozuurmengsel bestaande uit: glycine, threonine, alanine, leucine (samen 95 γ), asparaginezuur (20 γ) en glutaminezuur (40 γ), totaal opgebracht 155 γ.
c. oplossing $A_{2\cdot2}$. (zie schema 1), opgebracht 0,1 ml.
a en c^2 gekleurd met anilinefosfaat; b en c^1 met ninhydrine.
Er werd 7¾ h geëlektroforeerd bij pH 7,8 (fosfaatbuffer) en 360 V op Whatman 3MM filtreerpapier.
De activiteitspercentages van de extracten der zones 1, 2 en 3 (zie c^1 en c^2), bepaald tegen T.M.V. op *Nicotiana glutinosa*, bedroegen respectievelijk 100, 66 en 4,9.

Photogr. 6.
Electropherograms of:
a. glucose, applied 125 γ.
b. an amino-acid mixture containing: glycine, threonine, alanine, leucine (in total 95 γ), aspartic acid (20 γ), glutamic acid (40 γ), applied a total of 155 γ.
c. solution $A_{2\cdot2}$. (see scheme 1), applied 0.1 ml.
a and c^2 sprayed with aniline phosphate (sugar) reagent, b and c^1 with ninhydrin.
Electrophoresis for 7¾ hrs. at pH 7.8 (phosphate buffer) and 360 V on Whatman 3MM filterpaper.
Activity percentages of extracts from zones 1, 2 and 3 (see c^1 and c^2) as determined against T.M.V. on Nicotiana glutinosa are 100, 66 and 4.9 respectively.

T. Pl.ziekten 63 (1957): 345–360

OVER DE WAARDPLANTEN VAN *PRATYLENCHUS PENETRANS*

With a summary: On the host plants of Pratylenchus penetrans[1])

DOOR

M. OOSTENBRINK, J. J. s'JACOB en K. KUIPER
Plantenziektenkundige Dienst (P.D.), Wageningen

INLEIDING

De waardplantenreeks van het wortelaaltje *Pratylenchus penetrans* (COBB) SHER et ALLEN is nog onvolledig bekend. Meldingen uit de tijd vóór de taxonomische revisie van het geslacht *Pratylenchus* door SHER & ALLEN (1953) zijn weinig betrouwbaar, aangezien achteraf meestal niet meer is te beoordelen, met welke *Pratylenchus*-soort werd gewerkt. SHER & ALLEN noemden negen waardplanten. JENSEN (1953) vond bij een potproef 33 planten, in de wortels waarvan aaltjes voorkwamen in alle stadia van ontwikkeling. Alle door hem onderzochte plantesoorten bleken waardplanten te zijn; *Gramineae* bleken de aaltjes in het bijzonder aan te trekken. OOSTENBRINK (1954) noemde 16 gewassen, die in het veld door *P. penetrans* werden aangetast en een slechte groei vertoonden. GOODEY et al. (1956) noemden 45 waardplanten in hun samenvatting tot en met het jaar 1954, die overigens ten aanzien van *P. penetrans* niet geheel volledig was. Sindsdien zijn incidenteel nog enkele gewassen genoemd, o.a. een aantal bolgewassen (SLOOTWEG, 1956). Uit het bovenstaande blijkt, dat het aaltje zeer polyfaag is.

P. penetrans veroorzaakt bij verschillende gewassen verschijnselen van slechte groei („moeheidsverschijnselen"), die met de gebruikelijke vruchtopvolging niet kunnen worden bestreden. Om voor het onderzoek naar een meer geschikte vruchtwisseling een zo breed mogelijke basis te verkrijgen werd in de jaren 1954 tot en met 1956 getracht door eenvoudig vergelijkend onderzoek die gewassen op te sporen, die het minste door de aaltjes worden beschadigd en/of tot de geringste aaltjesvermeerdering aanleiding geven.

PROEFOPZET

Het onderzoek omvatte zes proeven in het veld, die door laboratoriumbepalingen werden aangevuld. De grond- en wortelmonsters werden op aaltjes onderzocht volgens de bij de P.D. gebruikelijke methoden (s'JACOB & STEMERDING, 1956). De proefvelden lagen alle op percelen zand- of dalgrond waarin, zoals uit vroeger onderzoek was gebleken, *P. penetrans* belangrijke schade aan boomkwekerijgewassen of aan aardappelen veroorzaakte, terwijl in deze percelen geen schadelijke concentraties van andere planteparasieten werden geconstateerd. Nadere gegevens over de proefvelden zijn vermeld in tabel 1. De te onderzoeken gewassen werden, zoveel mogelijk op de voor ieder gewas gebruikelijke wijze, geteeld op kleine veldjes of in rijtjes, en wel afhankelijk van de

[1]) Aangenomen voor publikatie 7 december 1957.

proef in twee- tot vijfvoudige herhaling. Dit geschiedde zowel op besmette stroken als op stroken waar de aaltjespopulatie door grondontsmetting met het nematicide DD grotendeels was gedood. Wanneer bepaalde gewassen, ondanks goede bemesting en verzorging, op de besmette grond duidelijk slechter groeiden dan op de aangrenzende ontsmette stroken, werd dit verschil in groei vastgelegd en gebruikt als aanwijzing voor de door de aaltjes veroorzaakte schade. Voor dit begrip wordt hier de term „vatbaarheid voor schade" voorgesteld, een term die in de Engelse literatuur als „susceptibility to damage" reeds wordt gebruikt.

De mate waarin de aaltjes zich onder invloed van de verschillende gewassen vermeerderen werd vergelijkenderwijze bepaald door wortelmonsters uit de onbehandelde grond te nemen en deze in het laboratorium op hun *Pratylenchus*-besmetting te onderzoeken. Dit onderzoek geschiedde per 10 g fijne wortels; een kleinere hoeveelheid werd op 10 g omgerekend.

Planten en zaden van de onderzochte soorten werden van verschillende telers, proeftuinen en instituten betrokken. De identiteit van de gewassen werd zonodig door gewassen-specialisten te velde gecontroleerd; de vermelde namen zijn volgens Boom (1949, 1950). Er werden gegevens verkregen van 164 plantesoorten en -variëteiten. Daar enkele soorten in meer dan één vorm voorkwamen, waren er in totaal 182 gewassen, namelijk 100 boomkwekerijgewassen en 82 andere (land- en tuinbouwgewassen, kruiden en sierplanten). Het betrof steeds gezaaide, of in hetzelfde jaar uit zaad opgekweekte planten, tenzij in tabel 2 anders is vermeld. Gewassen, die bij de proeven niet opkwamen of om andere reden moesten uitvallen, zijn buiten beschouwing gebleven.

Resultaten

De grondontsmetting gaf op alle percelen een doding van de wortelaaltjes, variërende van 88 tot 97 % van de populatie voorkomende in de onbehandelde stroken. De *Pratylenchus*-besmetting bleek bij het begin van het proefjaar op alle percelen overwegend uit *P. penetrans* te bestaan. Tabel 1 vermeldt, naast enkele andere gegevens, de uitgangsbesmettingsgraad van de grond en de gemiddelde wortelaantasting van de gewassen. Uit de cijfers blijkt, dat bij alle proeven een duidelijke wortelaantasting door *Pratylenchus* is opgetreden. Deze was, waarschijnlijk door de lichtere besmetting van de grond, bij de proeven 2 en 5 geringer dan bij de andere.

Tabel 1. Algemene gegevens over de veldproeven
General data of the field trials

Nummer en naam *Number and name*	Oorspronkelijke *Pratylenchus*-besmetting per 200 ml grond *Original Pratylenchus populations per 200 ml of soil*	Gemiddeld aantal *Pratylenchus* per 10 g wortels van alle onderzochte gewassen. Tussen haakjes: aantal gewassen en bemonsteringsdatum *Mean number of Pratylenchus per 10 g of roots of all crops tested. Between brackets: number of crops and sampling date*	
1	2	3	4 5
1. Heiligerlee 1954 A	168	7160	(112 ; 16.7.'54)
2. Heiligerlee 1954 B	83	1328	(53 ; 16.7.'54)
3. Winschoten 1955	343	6174	(71 ; 4.8.'55)
4. Overloon 1955	>370	6055	(41 ; 21.7–30.8.'55)
5. Overloon 1956	102	2808	(9 ; 23.6.'56)
6. Noordbroek 1956	160	6624	(22 ; 5.9.'56)

FIG. 1. *Sorbus aucuparia* (No. 95 van tabel 2) uit proef 1 op 16/7/'54. Rechts: drie herhalingen van met *Pratylenchus penetrans* besmette grond: gemiddeld 2256 *Pratylenchus* per 10 g wortels. Links van ontsmette grond: gemiddeld 43 *Pratylenchus* per 10 g wortels. Bij de niet-gerooide herhalingen was het lengteverlies in september 1954 opgelopen tot 93% van „ontsmet".
Sorbus aucuparia (No. 95 of table 2) in trial 1 at 16/7/'54. Right: three replications of soil infested by Pratylenchus penetrans: on an average 2256 Pratylenchus per 10 g of roots. Left of disinfested soil: on an average 43 Pratylenchus per 10 g of roots. Unlifted replications showed length reduction of 93% of „disinfested" in September 1954.

FIG. 2. *Prunus cerasiferae* (No. 66 van tabel 2) uit proef 1 op 16 7 '54. Rechts: drie herhalingen van met *Pratylenchus penetrans* besmette grond: gemiddeld 6528 *Pratylenchus* per 10 g wortels. Links van ontsmette grond: gemiddeld 10 *Pratylenchus* per 10 g wortels. Bij de niet-gerooide herhalingen was het lengteverlies in september 1954 46% van „ontsmet".
Prunus cerasiferae (No. 66 of table 2) in trial 1 at 16/7/'54. Right: three replications of soil infested by Pratylenchus penetrans: on an average 6528 Pratylenchus per 10 g of roots. Left of disinfested soil: on an average 10 Pratylenchus per 10 g of roots. Unlifted replications showed length reduction of 46% of „disinfested" in September 1954.

FIG. 3. Onderstammen van appel, *Malus pumila* (EM-type I, No. 49 van tabel 2) uit proef 1 op 24/9/'54. Rechts van met *Pratylenchus penetrans* besmette grond: 6122 *Pratylenchus* per 10 g wortels. Links van ontsmette grond: 30 *Pratylenchus* per 10 g wortels. Lengteverlies van de scheuten 68% van „ontsmet".
Rootstocks of apple, Malus pumila (EM-type I, No. 49 of table 2) in trial 1 at 24/9/'54. Right in soil infested by Pratylenchus penetrans: 6122 Pratylenchus per 10 g of roots. Left in disinfested soil: 30 Pratylenchus per 10 g of roots. Length reduction of the new shoots 68% of „disinfested".

Elk van de zes veldproeven heeft gegevens opgeleverd over de aaltjesaantasting van de wortels en de schade aan een groot aantal gewassen. Het cijfermateriaal zal hier niet volledig worden weergegeven. De belangrijkste getallen zullen in de discussie afzonderlijk worden genoemd, terwijl in de tabellen 2 en 3 ten aanzien van elk gewas of elke gewassengroep een conclusie is vermeld die de gegevens uit alle veldproeven samenvat.

Kolom 1 van tabel 2 geeft de onderzochte gewassen weer, namelijk eerst de boomkwekerijgewassen in alfabetische volgorde en daarna de overige gewassen alfabetisch volgens familie en soort gerangschikt. Achter elk gewas staan de nummers vermeld uit tabel 1 van de veldproeven waarin het gewas werd getoetst.

In kolom 2 van tabel 2 is de vatbaarheid voor schade vermeld, dat wil dus zeggen het relatieve groei- of opbrengstverlies bij de verschillende gewassen. Dit is, op elk proefveld afzonderlijk, bepaald door visuele beoordeling, lengtemeting en of weging, met „ontsmet" als uitgangspunt. Fig. 1, 2 en 3 geven, aan de hand van gerooide gewassen, een indruk van deze verschillen en van de daarbij optredende variatie. Gewassen, die op de „besmette" grond regelmatig een duidelijk groeiverlies ten opzichte van de „ontsmette" grond vertoonden, zijn in kolom 2 met een + gemerkt. Wanneer de groeireducties minder groot of minder betrouwbaar waren, is een vermeld en als geen verschillen optraden een —. Bij enkele gewassen waren de gegevens van de verschillende veldproeven niet gelijkluidend en kon geen conclusie worden getrokken.

Kolom 3 van tabel 2 geeft de *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels van de verschillende gewassen weer. Er is in de regel aan twee rijtjes van de onbehandelde grond een bepaling per 10 g wortels verricht, waaruit een gemiddelde dichtheid per gewas werd verkregen. Deze uitkomsten per gewas zijn uitgedrukt in procenten van het proefveldgemiddelde. Hierdoor werd het minder bezwaarlijk om de gegevens van de verschillend zwaar besmette proefvelden met elkaar te vergelijken en ze tot een algemeen gemiddelde te verwerken, zoals dit in tabel 2 is geschied. Uit een wiskundige analyse van de afzonderlijke getallen is gebleken, dat bij het wortelonderzoek alleen grote verschillen, hier ter grootte van het gemiddelde van de te vergelijken getallen, betrouwbaar zijn. Met het oog hierop, en ook ter vereenvoudiging van de discussie, zijn de *Pratylenchus*-dichtheden in tabel 2 in drie klassen ingedeeld, waarbij de gewassen met een zeer lage en met een zeer hoge dichtheid duidelijk aangegeven zijn. Voor de vier zwaar besmette proefvelden (tabel 1) komen de aanduidingen $< 15\%$, 15 150% en $> 150\%$ ongeveer overeen met < 1000, 1000–10000 en > 10000 *Pratylenchus* per 10 g wortels.

Bij de aanvang van de proeven bleek *P. penetrans* in de grond de enige of de talrijkste *Pratylenchus*-soort te zijn. De in de tabellen vermelde aaltjesgetallen van het wortelonderzoek betreffen het geslacht *Pratylenchus* als geheel. Door determinatie van enkele volwassen exemplaren bij sterke vergroting werd de zekerheid verkregen, dat uit alle getoetste gewassen steeds *P. penetrans* is verkregen. Bij een aantal gewassen, die met behulp van wortelkleuring nader werden onderzocht, waren alle stadia van dit aaltje in de wortels aanwezig. Hierbij waren ook de gewassen met de laagste aaltjesdichtheid, zoals *Tagetes*- en *Beta*-soorten.

Verscheidene gewassen hebben in alle proeven duidelijke moeheidsverschijnselen vertoond, terwijl de grondbehandeling met DD de groeikracht van deze gewassen volkomen herstelde. Dit mocht ook worden verwacht op grond van de voorgeschiedenis van de percelen en de aanwezigheid van *P. penetrans*, waarvan de betekenis als parasiet bij vroeger onderzoek reeds was gebleken. Hoewel enige reserve blijft geboden schrijven wij groeiverschillen tussen „ontsmet" en „besmet" aan *P. penetrans* toe. Hierbij wordt overwogen, dat de grondbehandeling met DD op zichzelf geen merkbare invloed heeft gehad op de algemene vruchtbaarheidstoestand van deze percelen. In alle proeven kwamen vele gewassen voor, die zowel op de besmette als de ontsmette grond goed groeiden en waarvan de groei door de behandeling niet merkbaar werd bevorderd, zoals bieten, koolsoorten en verschillende granen. Dit sluit aan bij het reeds eerder vermelde inzicht, dat op goed bemeste grond het effect van een DD-behandeling een bruikbare indicator is voor de schadelijke invloed der aaltjes (Oostenbrink, 1956a). In de proefpercelen kwamen ook andere planteaaltjes voor, maar hun aantallen waren zo gering, dat zij waarschijnlijk niet van betekenis zijn geweest. De mogelijkheid, dat een nevenwerking van DD of het optreden naast *P. penetrans* van andere aaltjes storende factoren zijn geweest, is bij dit soort proeven evenwel niet geheel uit te sluiten. Voor de opzet van het onderzoek kan dit echter niet bezwaarlijk geweest zijn, daar in de eerste plaats werd gezocht naar gewassen die geen schade vertoonden en/of geen aaltjes in de wortels hadden.

P. penetrans blijkt aanwezig te zijn in de wortels van alle in tabel 2 genoemde gewassen, zij het in zeer verschillende dichtheden, variërend van 23 bij *Tagetes patula* in proef 3, tot ruim 106.000 bij *Vicia faba* in proef 1. Daar zelfs in de wortels van de lichtst aangetaste gewassen blijkbaar nog aaltjes voorkomen die zich reproduceren, zouden al deze gewassen volgens de huidige opvatting als waardplant kunnen worden beschouwd. De reeds eerder genoemde polyfagie van *P. penetrans* is volgens deze maatstaf dus wel zeer uitgebreid.

Uit tabel 2 blijkt, dat de schade bij de gewassen dikwijls niet parallel gaat met de aaltjesdichtheid in de wortels. De omvang van het wortelstelsel of andere specifieke factoren zijn hier blijkbaar ook van belang. Het is duidelijk, dat het gebruikelijke begrip „waardplant" hier weinig inzicht geeft in de verhouding plant – parasiet. Bij aantasting door een polyfage aaltjessoort, zoals *P. penetrans*, blijken de eigenschappen van een gewas slechts te kunnen worden beoordeeld, wanneer afzonderlijke gegevens beschikbaar zijn over de schade en over de efficiëntie van de aaltjesvermeerdering per bepaalde hoeveelheid wortels of, beter nog, per oppervlakte-eenheid van het gewas of van de grond. Jones (1956) kwam met betrekking tot het bietecystenaaltje tot dezelfde conclusie.

De gunstigste gewassen op met *P. penetrans* besmette grond zijn die, welke zich op de „besmette" zowel als „ontsmette" grond normaal ontwikkelen en die tevens weinig aaltjes in de wortels hebben. Deze gewassen lopen zelf geen gevaar en zuiveren de grond ten behoeve van andere, gevoeliger gewassen. Volgens tabel 2 is deze combinatie van eigenschappen geconstateerd bij de no's 34, 101, 102, 103, 112, 113, 116, 119. Dit zijn achtereenvolgens *Daphne mezereum*, voeder-, suiker- en rode biet, grote en kleine afrikaan, stoppelknol en zomerkoolzaad. Voor bieten en afrikanen werd dit bij later onderzoek bevestigd; de andere gewassen worden nog nader onderzocht.

Het niét optreden van schade bij bepaalde gewassen (— in kolom 2 van tabel 2) is op zichzelf reeds van betekenis voor het samenstellen van een geschikte vruchtwisseling op besmette grond; voor een geringe aaltjesdichtheid in de wortels (— in kolom 3) geldt hetzelfde. Het eerste wordt van nog acht, het laatste van nog twaalf gewassen in tabel 2 vermeld.

Ook andere gewassen kunnen echter op met *P. penetrans* besmette grond in de vruchtomloop gunstig afsteken. Het is namelijk waarschijnlijk, dat de besmettingsniveaus in de praktijk in de regel lager zullen zijn dan op de proefvelden het geval was, en dat daar méér gewassen geen schade zullen ondervinden dan uit kolom 2 blijkt. Gewassen met een kleine wortelmassa kunnen verder een laag besmettingsniveau achterlaten, ook als zij in kolom 3 niet tot de categorie behoren met de laagste *Pratylenchus*-dichtheid per 10 g wortels. Hierover kan echter geen uitsluitsel worden gegeven, tenzij gegevens van andere herkomst betreffende de wortelmassa van de verschillende gewassen in de berekening worden betrokken. Dergelijke gegevens zijn van slechts enkele gewassen bekend (Goedewaagen & Schuurman, 1950).

Wanneer we de planten en plantegroepen beschouwen en daarbij de volgorde in tabel 2 aanhouden, dan is nog het volgende op te merken. De boomkwekerijgewassen blijken vrijwel zonder uitzondering te worden geschaad. Het lengteverlies was in de regel meer dan 50 % en soms meer dan 90 % (fig. 1 en 2). Van de 84 soorten en variëteiten (no's 1–100) zijn er in de tabel 61 als duidelijk en 16 als waarschijnlijk vatbaar geklasseerd. Alleen bij *Daphne mezereum* is geen schade opgetreden, doch dit betreft een moeilijk te beoordelen gewas en de mogelijkheid bestaat, dat het door bijkomstige omstandigheden aan de gevolgen van de aantasting is ontsnapt. Over zes gewassen is geen oordeel gegeven.

De *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels werd bij 13 boomkwekerijgewassen hoog, bij 55 middelmatig en bij 10 laag bevonden, terwijl van zes geen aantal was bepaald. Zeer lage aantallen per 10 g wortels werden gevonden bij *Larix leptolepis* (100, in proef 3), *Daphne mezereum* (316 en 60, in de proeven 1 en 3), *Gaultheria procumbens* (305, in proef 1) en *Rosa succes* (483, in proef 6). Zeer hoge aantallen werden gevonden bij *Betula pendula* (26.700, in proef 3), *Prunus spinosa* (24.500, in proef 1), *Cytisus scoparius* (23.900 in proef 1) en *Prunus insititiae* (21.800 in proef 6). Opgemerkt zij, dat bij zeer gevoelige gewassen de lage aaltjesdichtheid een gevolg kan zijn van een op de aantasting volgend wortelrot. Andere gewassen kunnen, ondanks grote aaltjesdichtheid in de wortels, tengevolge van een geringe wortelmassa een matige aaltjesvermeerdering geven en dus goede voorvruchten zijn. Vroeger onderzoek wees uit, dat dit bij een aantal boomkwekerijgewassen het geval is (Oostenbrink, 1956b).

Drie geslachten van boomkwekerijgewassen, waarvan om praktische redenen veel vertegenwoordigers zijn getoetst, zijn: *Malus*, *Prunus* en *Rosa*. Bij *Malus pumila* blijken de EM-typen alle middelmatig tot veel *Pratylenchus* te herbergen en alle duidelijk schade te lijden (type XIII, dat niet kon worden beoordeeld, buiten beschouwing gelaten). De schade blijkt bij dit „afgelegde" materiaal niet minder opvallend te zijn dan bij gezaaid materiaal. Fig. 3 geeft hiervan een indruk. Bij type VII was de schade iets minder dan bij de andere typen. Ook de onderzochte *Prunus*-soorten blijken alle duidelijk schade te lijden. Bij alle werd tevens een middelmatige tot hoge aaltjesdichtheid in de wortels geconstateerd, behalve bij *Prunus serotina*. Deze soort verdient nadere aandacht. De

Rosa-soorten vertonen onderling significante verschillen in de schade en in de aaltjesdichtheid in de wortels. Deze verschillen, die voor de rozenkwekerij misschien van betekenis zijn, komen in tabel 2 onvoldoende tot uiting; zij zullen op een andere plaats uitvoeriger worden beschreven.

Van de land- en tuinbouwgewassen vormen de *Chenopodiaceae* een groep van gewassen, die geen schade lijden en die weinig aaltjes in de wortels hebben. Nader onderzoek heeft bevestigd, dat bieten goede gewassen ter bestrijding van *P. penetrans* zijn.

De *Compositae* gedragen zich zeer verschillend. Enkele gewassen, zoals witlof en andijvie, lijden duidelijk schade. Afrikanen zijn ongevoelig en hebben weinig aaltjes in de wortels. Zij hebben een uitzonderlijk sterke, reinigende invloed op met *Pratylenchus*-soorten besmette grond. Hierop wordt in een afzonderlijke publikatie teruggekomen.

De meeste *Cruciferae* lijden geen schade. Zij veroorzaken in de regel een matige aaltjesvermeerdering. Bij zomerkoolzaad en stoppelknol werd daarentegen een lage aaltjesdichtheid in de wortels gevonden. Het is van belang om na te gaan, of deze gewassen, als groenbemestingsgewassen geteeld, een gunstige invloed kunnen hebben op met *P. penetrans* besmette grond.

De *Gramineae* gedragen zich ten aanzien van *P. penetrans* verschillend. Haver, gerst en rogge vertonen geen schade, mais en verscheidene weidegrassen wel. De aaltjesdichtheid in de wortels is middelmatig tot hoog. Rekening houdende met de meestal grote wortelmassa moet bij verbouw van *Gramineae* op een sterke vermeerdering van de aaltjes worden gerekend. Door nader onderzoek is dit voor rogge en haver bevestigd; zij zijn op besmette grond dan ook zeer slechte voorvruchten voor gevoelige gewassen gebleken.

Van de *Papilionaceae* blijken hopperupsklaver, luzerne, erwt, rode klaver en wikke in elk geval schade te lijden, terwijl over andere vlinderbloemige gewassen geen zekerheid bestaat. Zij hebben in het algemeen zeer veel aaltjes in de wortels, meer dan een der andere plantefamilies, hetgeen duidelijk blijkt uit tabel 3. Gemiddeld was bij de *Papilionaceae* de aaltjesdichtheid 2,4 keer zo groot als het gemiddelde van alle getoetste gewassen en meer dan 12 keer zo groot als het gemiddelde van de *Chenopodiaceae*. Bij elk proefveld betreffen de hoogste twee *Pratylenchus*-dichtheden dan ook steeds vlinderbloemigen (proefveld 6, waar geen vlinderbloemigen werden getoetst, buiten beschouwing gelaten). Kolom 3 van tabel 2 geeft een hoge aaltjesdichtheid aan voor lupine, hopperupsklaver, serradella, snijboon, stamboon, peul, doperwt, soja, tuinboon en voederwikke. Wanneer bovendien de zeer grote wortelmassa van vele vlinderbloemigen, vooral van de verschillende klaversoorten, in aanmerking wordt genomen, dan moeten zij wel tot de meest efficiënte waardplanten van *P. penetrans* worden gerekend. Dit maakt o.a. de teelt van vlinderbloemige groenbemesters op met dit aaltje besmette grond problematiek. Ook in de groep van de boomkwekerijgewassen, waarin verschillende plantefamilies zijn samengevat, blijken de *Papilionaceae* veel aaltjes te bevatten.

Van de *Solanaceae* vertonen aardappel en vooral tomaat duidelijke schade. Zij bevatten middelmatig veel aaltjes in de wortels.

Ook verscheidene *Umbelliferae* lijden schade. In de wortels van de verschillende gewassen komen middelmatige tot hoge aaltjesdichtheden voor.

Van de groep der „Overige plantesoorten" blijkt komkommer ernstige schade te vertonen, evenals montbretia, aardbei en framboos. Narcis en verscheidene

TABEL 3. Gemiddeld aantal *Pratylenchus* per 10 g wortels voor elk der in tabel 1 genoemde gewassengroepen, voor elke proef afzonderlijk berekend uit de oorspronkelijke gegevens. Tussen haakjes het aantal gewassen, waarvoor de aaltjesaantallen beschikbaar waren.
Mean number of Pratylenchus per 10 g of roots of each crop group in table 1, for each of the trials calculated from the original data. Between brackets: number of plant species of which the eelworm counts were available.

Gewassengroep *Crop group* / Proef *Trial*	1	2	3	4	5	6	Algemeen gemiddelde per gewassengroep *General mean per group of crops*
Algem. gemiddelde per proef *General mean per trial*	7160 = **100** (*112*)	1328 = **100** (*53*)	6174 = **100** (*71*)	6055 = **100** (*41*)	2808 = **100** (*9*)	6624 = **100** (*22*)	5617 = **100** (*308*)
Boomkwekerijgew. (versch. fam.)	72 (*70*)	98 (*1*)	96 (*34*)	116 (*12*)	–	123 (*16*)	104 (*133*)
Chenopodiaceae	20 (*4*)	31 (*3*)	16 (*3*)	28 (*3*)	14 (*1*)	–	19 (*14*)
Compositae	37 (*1*)	68 (*6*)	31 (*3*)	34 (*2*)	–	53 (*3*)	34 (*15*)
Cruciferae	30 (*9*)	79 (*6*)	22 (*6*)	76 (*5*)	–	–	39 (*26*)
Gramineae	75 (*6*)	27 (*9*)	81 (*8*)	63 (*8*)	–	–	61 (*31*)
Papilionaceae	**321** (*10*)	**212** (*11*)	**384** (*6*)	**209** (*6*)	**167** (*4*)	–	**239** (*37*)
Solanaceae	89 (*2*)	81 (*4*)	49 (*2*)	59 (*2*)	–	–	54 (*10*)
Umbelliferae	138 (*4*)	167 (*3*)	8 (*3*)	40 (*1*)	–	–	81 (*11*)
Overige plantesoorten	231 (*6*)	82 (*10*)	83 (*6*)	33 (*2*)	54 (*4*)	22 (*3*)	96 (*31*)

sierteeltgewassen en kruiden zijn als waarschijnlijk vatbaar genoteerd. Opvallend is de lage aaltjesdichtheid in de wortels van lelietje der dalen, montbretia en narcis, en de zeer hoge dichtheid bij sjalot, prei en vlas. Ook hier geldt, dat de lage aaltjesdichtheid bij enkele van deze gewassen een secundair gevolg van grote gevoeligheid kan zijn.

Binnen de genoemde groepen vertonen de gewassen dus vaak grote verschillen. Bij het verdere onderzoek zijn de gegevens van elk gewas afzonderlijk van betekenis. Aanwijzingen voor de praktijk kunnen uit de vermelde gegevens niet dadelijk worden verkregen, voornamelijk omdat de dichtheid per wortelmonster een onvolledige maat is voor de vermeerdering van de aaltjes, tenzij tevens concrete gegevens over de wortelmassa van de verschillende gewassen beschikbaar zijn. Bij het aansluitende onderzoek met verschillende vruchtopvolgingen is het verloop van de aaltjespopulatie dan ook zowel aan de hand van grondonderzoek als met behulp van wortelonderzoek gevolgd.

Velen hebben bij dit onderzoek hun medewerking verleend, waarvoor wij gaarne onze dank betuigen. Dit geldt in het bijzonder de heren G. H. JANSEN en F. H. W. A. WILDENBERG van de Kringen Winschoten en MILL van de P.D., onze assistenten in het laboratorium en de heer D. LINDNER, die de foto's heeft genomen. Verder danken wij Mr. F. G. W. JONES voor zijn hulp bij het maken van de Engelse samenvatting.

Summary

The behaviour of 164 cultivated plant species and varieties (crop numbers 1–182 in table 2) was compared in six field trials (1–6) on different soils in which *Pratylenchus penetrans* had previously appeared as a major problem in nursery stock or potatoes. Each crop was tested in two- to fivefold replication in one or more trials. Susceptibility to injury was estimated by comparisons of growth in infested and disinfested soil. Reproduction of *Pratylenchus* was evaluated by root examination according to a standardized procedure and was usually based on samples from two replicates.

Results are given in tables 1–3 and figures 1–3 and are summarized as follows:

1. In each trial conspicuous symptoms of sickness appeared in a number of crops, which were fully cured by treatment of the soil with the nematicide DD. They are tentatively attributed to *Pratylenchus penetrans* since no other potential cause of sickness symptoms could be traced. Other root infesting nematodes, however, were present in small numbers. This should be borne in mind as a possible limitation of the conclusions. DD-treatment did not have a general soil amendment effect in these soils which received artificial fertilizers.

2. The roots of all crops harboured *P. penetrans*. The population density varied from 23 (*Tagetes patula* in trial 3) to about 106,000 (*Vicia faba* in trial 1) per 10 g of roots. Eggs and young larvae were present in the roots of *Tagetes patula* and other plants with a low eelworm density. It is therefore probable that all plant species tested permit at least some eelworm reproduction and could therefore be considered host plants of *P. penetrans*. However, susceptibility to injury and eelworm density in the roots show a divergence, as can be seen from table 2 (see also Oostenbrink, 1956b). It is therefore desirable to replace the indication host plant by separate indications of susceptibility to injury and of host efficiency (i.e. eelworm density per unit root weight or rather per plant or per area of the field).

3. Two conditions favouring high crop yield – lack of susceptibility to injury and low eelworm density in the roots – were found in combination in eight crops, while the former condition was found alone in another eight crops and the latter in another 12 crops (table 2, columns 2 and 3). On moderately infested soil more crops may remain undamaged than in the trial fields. Crops with a small root mass may prove to be good crops to precede a susceptible crop in a rotation in spite of moderate or high eelworm density in the roots.

4. Nearly all woody perennials (table 2, column 2) proved to be susceptible or probably susceptible to injury. Only *Daphne mezereum* is classified as nonsusceptible, but its status is questionable. The density of *Pratylenchus* in the roots of these crops varies widely, but total eelworm reproduction may be low in woody perennials since the root mass is usually small (l.c.). EM-type VII may be less susceptible to injury than other types of *Malus pumila* rootstocks. *Prunus serotina* seems to support the lowest eelworm level of the *Prunus* species tested. There seem to be differences of practical importance between *Rosa* species in susceptibility and eelworm reproduction (table 2).

5. The *Chenopodiaceae* contain a group of crops not susceptible to injury which support little eelworm reproduction (table 2, column 2 and 3). *Beta vulgaris*, have already proved to be favourable crops for the control of *P. penetrans* by means of crop rotation (l.c.).

6. *Compositae* are variable in their host-parasite relationships. African violets, *Tagetes patula* and *T. erecta*, are not susceptible and have been shown to suppress *P. penetrans* more strongly than any other crop tested so far.

7. Nearly all *Cruciferae* appear not to be susceptible to injury supporting a moderate eelworm density in the roots. Summer rape (*Brassica napus*) and turnip (*Brassica campestris rapa*) had a relatively low eelworm density in the roots and may be useful as green manure crops in infested soil.

8. The *Gramineae* include crops not susceptible to injury, such as oats (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*) and rye (*Secale cereale*), but also susceptible crops, such as corn (*Zea mays*) and several grass species. Eelworm density in the roots is moderate to high. With some *Gramineae* uncommonly high eelworm reproduction must be expected, because of their extensive root mass. Rye and oats have already proved to be such crops (l.c.).

9. A number of *Papilionaceae* (*Medicago lupulina*, *M. sativa*, *Pisum sativum vulgare*, *Trifolium pratense* and *Vicia sativa*) are susceptible to injury and other species are doubtful. The *Papilionaceae* as a group revealed an eelworm density more than twice as high as any of the other groups of crops and more than 12 times as high as the *Chenopodiaceae* (table 3). In each trial field members of the *Papilionaceae* showed the highest eelworm densities of the series tested. Clovers, and other members of the *Papilionaceae*, are known to have large root masses. These crops would be expected to build up a very high eelworm population and there are indications that this may obscure or reverse the otherwise favourable effect of papilionaceous crops as green manures.

10. The *Solanaceae*, *Umbelliferae* and the „Other plant species" in table 2 include several susceptible crops (*Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Daucus carota*, *Crocosmia crocosmiflora*, *Cucumis sativus*, *Fragaria ananassa*, *Rubus idaeus* and probably others). Most species in these groups show a moderate eelworm density in the roots. A high density was found in *Angelica archangelica*, *Allium ascalonicum*, *A. porrum* and *Linum usitatissimum*, a low density in *Convallaria majalis*, *Crocosmia crocosmiflora* and *Narcissus pseudonarcissus*. Low eelworm density in susceptible crops may, however, be an indirect consequence of root deterioration.

These results serve as a base for further crop rotation experiments for the control of *P. penetrans*. Each crop has to be considered individually in this respect. Practical conclusions from the foregoing data, however, are preliminary since some limitations are always inherent in field work and since eelworm density per unit of root is an incomplete indication for eelworm reproduction per unit volume of soil (unless pertinent data about root mass of the crops are available as well). Further work with selected rotations are therefore supported by the examination of soil samples in addition to root examination.

LITERATUUR

Besemer, A. F. H. & M. Oostenbrink, – 1955. Phytotoxische en nematicide nawerking van grondontsmettingen met DD. Meded. Landbouwhogeschool Gent 20: 279–290.

Boom, B. K., – 1949, 1950. Flora der cultuurgewassen van Nederland, Deel I, 3e druk en Deel II. Veenman & Zonen, Wageningen.

Goedewaagen, M. A. J. & J. J. Schuurman, – 1950. Wortelproductie op bouw- en grasland als bron van organische stof in de grond. Landbouwk. T. 62: 469–482.

GOODEY, T., J. B. GOODEY & MARY T. FRANKLIN, – 1956. The nematode parasites of plants catalogued under their hosts. Commonwealth Agr. Bur., Farnham Royal, Bucks., 140 p.
S'JACOB, J. J. & S. STEMERDING, – 1956. Een handleiding voor Nematologie. Plantenziektenk. Dienst. Overdruk 120: 73–93.
JENSEN, H. J., – 1953. Experimental greenhouse host range studies of two root-lesion nematodes, Pratylenchus vulnus and Pratylenchus penetrans. Pl. Dis. Rep. 37: 384–387.
JONES, F. G. W., – 1956. Soil populations of beet eelworm (Heterodera schachtii Schm.) in relation to cropping. II. Microplot and field plot results. Ann. app. Biol. 44: 25–56.
OOSTENBRINK, M., – 1954. Over de betekenis van vrijlevende wortelaaltjes in land- en tuinbouw. Versl. Meded. Plantenziektenk. Dienst 124: 196–233.
OOSTENBRINK, M., – 1956a. De postulaten van Koch en enige andere mogelijkheden van bewijsvoering in de nematologie. Meded. Landbouwhogeschool Gent 21: 341–350.
OOSTENBRINK, M., – 1956b. Over de invloed van verschillende gewassen op de vermeerdering van en de schade door Pratylenchus pratensis en Pratylenchus penetrans (Vermes, Nematoda). T. Pl. ziekten 62: 189–203.
SHER, S. A. & M. W. ALLEN, – 1953. Revision of the genus Pratylenchus (Nematoda: Tylenchidae). Univ. Cal. Publ. Zool. 57: 441–470.
SLOOTWEG, A. F. G., – 1956. Rootrot of bulbs caused by Pratylenchus and Hoplolaimus spp. Nematologica 1: 192–201.

TABEL 2. Vatbaarheid voor schade en *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels van 164 cultuurplanten (182 gewassen) op met *Pratylenchus penetrans* besmette grond. Samenvatting van de resultaten van verschillende veldproeven.
Susceptibility to injury and Pratylenchus density in the roots of 164 cultivated plant species (182 crops) in fields, infested with Pratylenchus penetrans. Pooled results of different field trials.

Gewassen *Crops*	Veldproefnummers (zie tabel 1) *Field-trial numbers (c.f. table 1)*	Vatbaarheid voor schade *Susceptibility to injury* + vatbaar *susceptible* + waarschijnlijk vatbaar *probably susceptible* — waarschijnlijk niet vatbaar *probably not susceptible* • geen conclusie *no conclusion*	Relatieve *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels *Comparative Pratylenchus density in the roots* = < 15% = = 15–150% = = = >150%
1		2	3
BOOMKWEKERIJGEWASSEN			
1. *Abies alba* MILL.	1	•	= =
2. *Acer campestre* L.	1	+	= =
3. – *negundo* L.	1	+	= =
4. – *platanoides* L.	1	+	= =
5. – *pseudoplatanus* L.	1	•	= =
6. *Aesculus hippocastanum* L.	1	+	= = =
7. – –, 1 jarig	3		
8. *Ailanthus glandulosa* DESF.	1	+	= =
9. *Alnus glutinosa* GAERTN.	1	+	= =
10. – *incana* MOENCH.	1	+	
11. *Amelanchier canadensis* MED., 1 jarig	1	+	= =
12. *Aronia arbutifolia* ELL.	1	+	
13. *Betula pubescens* EHRH.	1	+	
14. – *pendula* ROTH.	1	+	= = =
15. – –, 1 jarig	3		
16. *Berberis gagnepainii* SCHN.	1	+	= =
17. – *giraldii* HESSE	1	+	= =
18. – *julianae* SCHN.	1	+	= = =
19. – *thunbergii* DC.	1	+	= =
20. – – *atropurpurea* CHEN.	1	+	= =
21. *Cedrus atlantica* MAN.	1	+	= =
22. *Cercis siliquastrum* L.	1	+	= =
23. *Chaenomeles japonica* LDL.	1	+	= =
24. *Cornus sanguinea* L.	1	+	=
25. *Corylus avellana* L.	1	•	= =
26. *Cotinus coggygria* SCOP.	1	+	=
27. *Cotoneaster divaricata* R. et W.	1	+	
28. – *integerrima* Med.	1	+	= =
29. – *rotundifolia* LDL.	1	+	= =
30. – *simonsii* BAK.	1	+	= =
31. *Crataegus oxyacantha* L.	1	+	= =
32. *Cytisus nigricans* L.	1	+	= =
33. – *scoparius* LINK.	1	+	= = =
34. *Daphne mezereum* L., 1 jarig	1,3	—	=
35. *Elaeagnus angustifolia* L.	1	+	
36. *Fraxinus excelsior* L.	1	+	= =
37. *Fagus silvatica* L.	1	+	= =
38. – –, 1 jarig	3		

Vervolg *(continued)* tabel 2

Gewassen *Crops*	Veldproefnummers (zie tabel 1) *Field-trial numbers (c.f. table 1)*	Vatbaarheid voor schade *Susceptibility to injury* + vatbaar *susceptible* ± waarschijnlijk vatbaar *probably susceptible* — waarschijnlijk niet vatbaar *probably not susceptible* • geen conclusie *no conclusion*	Relatieve *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels *Comparative Pratylenchus density in the roots* = < 15% ± 15–150% = = = >150%
1		2	3
39. *Gaultheria procumbens* L., 1 jarig	1	•	=
40. *Ginkgo biloba* L.	1	+	= =
41. *Hibiscus syriacus* L.	1	+	= =
42. *Hippophae rhamnoides* L.	1	+	=
43. *Laburnum anagyroides* MED.	1	+	= = =
44. – –, 1 jarig	3		
45. *Larix leptolepis* GORD.	1,3,4	+	=
46. *Ligustrum ovalifolium* HASSK.	3,4,6	+	= =
47. *Liriodendron tulipifera* L.	1	+	=
48. *Malus pumila* MILL.	1,2,3,4,6	+	= =
49. – –, EM type I	1	+	= =
50. – –, EM type II	1,3,4	+	= =
51. – –, EM type IV	1,3,4,5	+	= =
52. – –, EM type VII	1,3,4	+	= = =
53. – –, EM type IX	1,3,4	+	= =
54. – –, EM type XI	1,3,4	+	= = =
55. – –, EM type XIII	1	•	= =
56. – –, EM type XVI	1	+	= = =
57. *Picea abies* KARST.	1,3,4	+	= =
58. – –, 1 jarig	3		
59. *Pinus montana mughus* WILLK.	1	+	= =
60. – *nigra austriaca* A. et G.	1	+	= =
61. – – *calabrica* SCHN.	1	+	=
62. – *silvestris* L.	1,3,4	+	= =
63. – –, 1 jarig	3		
64. *Populus hybr.* „*Serotina*", stek	3,4,5	+	= =
65. *Prunus avium* L.	1,3,4,5,6	+	= =
66. – *cerasiferae* EHRH.	1,3	+	= = =
67. – *domestica* L.	1,2,3,4	+	= =
68. – –, 1 jarig	3		
69. – *insititiae juliana* DC.	1,3,6	+	= = =
70. – *mahaleb* L.	1,6	+	= = =
71. – –, 1 jarig	3		
72. – *serotina* EHRH.	1	+	=
73. – *spinosa* L.	1	+	= = =
74. *Rhamnus cathartica* L.	1	+	= =
75. – *frangula* L.	1	+	= =
76. – –, 1 jarig	3		
77. *Ribes grossularia* L., stek	6	+	= =
78. – *nigrum* L., stek	3,6	+	= =
79. – *rubrum* L., stek	6	•	= = =
80. *Robinia pseudoacacia* L.	1	+	= =
81. – –, 1 jarig	3		
82. *Rosa canina* L.	1,3,4,5,6	+	= =

Vervolg *(continued)* tabel 2

Gewassen *Crops*	Veldproefnummers (zie tabel 1) *Field-trial numbers (c.f. table 1)*	Vatbaarheid voor schade *Susceptibility to injury* + vatbaar *susceptible* + waarschijnlijk vatbaar *probably susceptible* — waarschijnlijk niet vatbaar *probably not susceptible* • geen conclusie *no conclusion*	Relatieve *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels *Comparative Pratylenchus density in the roots* = < 15% == 15-150% === >150%
1		2	3
83. *Rosa canina* L., 1 jarig	3	+	==
84. – *eglanteria* L.	1		
85. – –,	3	+	==
86. – –, 2 jarig	6		
87. – *laxa* RETZ.	1,3		
88. – –, 2 jarig	6	+	==
89. – *multiflora* THBG	1,3,6		
90. – –, 1 of 2 jarig	3,6	+	==
91. – *rubrifolia* VILL.	1	+	==
92. – *rugosa* THBG	1,6		
93. – –, 1 jarig of stek	3,6	+	==
94. – *succes*, 2 jarig	6	+	=
95. *Sorbus aucuparia* L.	1	+	==
96. *Syringa vulgaris* L.	1	+	==
97. *Taxodium distichum* RICH.	1	+	==
98. *Thuja orientalis* L.	1	+	
99. *Viburnum lantana* L.	1	+	==
100. – *opulus* L., 1 jarig	1	+	==
LAND- EN TUINB.GEWASSEN			
CHENOPODIACEAE			
101. *Beta vulgaris alba* DC. (voederbiet)	1,2,3,4,5	—	=
102. – – *altissima* RÖSSIG (suikerbiet)	1,4	—	=
103. – – *rubra* L. (kroot)	1,2,3,4	—	=
104. *Spinacia oleracea* L. (spinazie)	1,2,3	—	==
COMPOSITAE			
105. *Achillea filipendulina* LAM.	2	+	==
106. *Artemisia dracunculus* L. (dragon)	2	•	==
107. *Cichorium endiva* L. (andijvie)	1,3,4,6	+	==
108. – *intybus* L. (witlof)	1,2	+	==
109. *Doronicum orientale* HOFFM. (voorjaarszonnebloem)	2	+	==
110. *Lactuca sativa* L. (sla)	1,3	•	==
111. *Scorzonera hispanica* L. (schorseneer)	2	•	==
112. *Tagetes erecta* L. (grote afrik.)	6	—	=
113. *Tagetes patula* L. (kleine afrik.)	3,4,6	—	=
114. *Taraxacum officinale* WEBER	2	•	==
CRUCIFERAE			
115. *Brassica campestris* L.	2	•	==

Gewassen *Crops*	Veldproefnummers (zie tabel 1) *Field-trial numbers (c.f. table 1)*	Vatbaarheid voor schade *Susceptibility to injury* + vatbaar *susceptible* + waarschijnlijk vatbaar *probably susceptible* — waarschijnlijk niet vatbaar *probably not susceptible* • geen conclusie *no conclusion*	Relatieve *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels *Comparative Pratylenchus density in the roots* = < 15% == 15–150% === >150%
1		2	3
116. *Brassica campestris rapa* (L.) HARTM. (stoppelknol)	1,3,4	—	=
117. – *cernua* (THBG) FORB. et HEMSL. (chinese kool)	2	+	==
118. – *hirta* MNCH (gele mosterd)	1	•	==
119. – *napus* L. (zomerkoolzaad)	1,2,3	—	=
120. – – *napobrassica* (L.) RCHB. (koolraap)	1,3,4	—	==
121. – *oleracea acephala laciniata* (L.) SCHULZ (boerenkool)	1,3,4	—	==
122. – – *botrytis cauliflora* (GARS.) DC.	2	•	==
123. – – *bullata gemmifera* (DC.) SCHULZ (spruitkool)	1,2	•	==
124. – – *bullata sabauda* (L.) SCHULZ (savoye kool)	1	•	==
125. – – *capitata sphaerica alba* DC. (witte kool)	1,3,4	+	==
126. – – – – *rubra* DC. (rode kool)	1,2,3,4	—	==
GRAMINEAE			
127. *Agrostis stolonifera* L. (fioringras)	2,3,4,5	+	==
128. *Avena sativa* L. (haver)	1,2,3,4	—	==
129. *Festuca rubra* L. (rood zwenkgras)	2	•	==
130. *Hordeum vulgare* L. (gerst)	1,2,3,4	—	==
131. *Lolium multiflorum* LAM. var. *westerwoldicum* (W.w. raaigras)	3,4	+	===
132. – *perenne* L. (Eng. raaigras)	2,3,4	+	==
133. *Phalaris canariensis* L. (kanariezaad)	1	+	==
134. *Phleum pratense* L. (timothee)	2	+	==
135. *Poa pratensis* L. (veldbeemdgr.)	2	+	==
136. *Secale cereale* L. (rogge)	1,2,3,4	—	==
137. *Triticum aestivum* L. (tarwe)	1,2,3,4	+	==
138. *Zea mays* L. (mais)	1,2,3,4	+	==
PAPILIONACEAE			
139. *Lupinus luteus* L. (gele lupine)	1,2,3,4,5	•	===
140. *Medicago lupulina* L. (hopperupsklaver)	1	+	===
141. – *sativa* L. (luzerne)	1,2,3,4	+	==

Vervolg *(continued)* tabel 2

Gewassen *Crops*	Veldproefnummers (zie tabel 1) *Field-trial numbers (c.f. table 1)*	Vatbaarheid voor schade *Susceptibility to injury* + vatbaar *susceptible* ± waarschijnlijk vatbaar *probably susceptible* — waarschijnlijk niet vatbaar *probably not susceptible* • geen conclusie *no conclusion*	Relatieve *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels *Comparative Pratylenchus density in the roots* < 15 % 15–150 % > 150 %
1		2	3
142. *Ornithopus sativus* BROT. (serradella)	1,2,3,4,5	•	= = =
143. *Phaseolus coccineus* L. (snijboon)	2	•	= = –
144. – *vulgaris* L. (stamboon)	1,2	•	= = =
145. *Pisum sativum saccharatum* (SER.) ALEF. (peul)	2	•	= = =
146. – – *vulgare* SCHÜBL. et MART. (doperwt)	1,2,3,4,5	+	= = =
147. *Soja max* (L.) PIPER (soja)	2	•	= = =
148. *Trifolium incarnatum* L. (incarnaatklaver)	1	•	= =
149. – *pratense* L. (rode klaver)	1,2,3,4,5	+	= =
150. – *repens* L. (witte klaver)	1,3,4,5	±	= =
151. *Vicia faba* L. (tuinboon)	1,2	•	= = =
152. – *sativa* L. (voederwikke)	1,2	+	= = =
SOLANACEAE			
153. *Atropa belladonna* L. (wolfskers)	2	•	= =
154. *Physalis franchetii* MAST. (Lampionplant)	2	•	= =
155. *Solanum lycopersicum* L. (tomaat)	1,2,3,4	+	= =
156. – *tuberosum* L. (aardappel)	1,2,3,4	+	= =
UMBELLIFERAE			
157. *Angelica archangelica* L. (engelwortel)	2	±	= = =
158. *Apium graveolens* L. (selderie)	1,3	+	= =
159. *Carum carvi* L. (karwij)	1	+	= =
160. *Daucus carota* L. (peen)	1,2,3,4,5	+	= =
161. *Foeniculum vulgare capillaceum* (GILIB.) HOLMB. (venkel)	2	•	= =
162. *Petroselinum crispum hortense* (HOFFM.) BOOM (peterselie)	1,3	•	= =
OVERIGE PLANTESOORTEN			
163. *Allium ascalonicum* L. (sjalot)	2,3	•	= = =
164. – *cepa* L. (ui)	3	•	= =
165. – *porrum* L. (prei)	1	•	= = =
166. *Aquilegia caerulea* JAMES (akelei)	2	±	= =
167. *Convallaria majalis* L. (lelietje der dalen)	3	•	=

Vervolg *(continued)* tabel 2

Gewassen *Crops*	Veldproefnummers (zie tabel 1) *Field-trial numbers (c.f. table 1)*	Vatbaarheid voor schade *Susceptibility to injury* + vatbaar *susceptible* + waarschijnlijk vatbaar *probably susceptible* — waarschijnlijk niet vatbaar *probably not susceptible* • geen conclusie *no conclusion*	Relatieve *Pratylenchus*-dichtheid in de wortels *Comparative Pratylenchus density in the roots* = < 15% == 15–150% === >150%
1		2	3
168. *Crocosmia crocosmiflora* (Lemne) N.E.Br. (montbretia)	5,6	+	=
169. *Cucumis sativus* L. (komkommer)	1,3,4	+	==
170. *Delphinium ajacis imperiale* (Voss) Boom (keizerriddersp.)	2	+	==
171. *Dianthus barbatus* L. (duizendschoon)	2	+	==
172. *Digitalis lanata* L. (wollig vingerhoedskruid)	2	+	==
173. – *purpurea* L. (vingerhoedskr.)	2	+	==
174. *Fragaria ananassa* Duch. (tuinaardbei)	3,4,5,6	+	==
175. *Geum coccineum* S. et S. (nagelkruid)	2	+	==
176. *Linum usitatissimum* L. (olievlas)	1	—	===
177. – – (olievlas)	1		
178. – – (vezelvlas)	1,2,3,5		
179. *Narcissus pseudonarcissus* L. (trompetnarcis)	5,6	+	=
180. *Papaver somniferum* L. (blauw-maanzaad)	1,2,5	•	==
181. *Rubus idaeus* L. (framboos)	5,6	+	==
182. *Viola tricolor* L. (driekleurig viooltje)	2	•	==

T. Pl.ziekten 63 (1957): 361–364

ELEKTRONENMICROSCOPISCHE WAARNEMINGEN OVER DE ZOÖSPOREN UIT DE ZOMERSPORANGIA VAN *SYNCHYTRIUM ENDOBIOTICUM* (SCHILB.) PERC.

With a summary: Electron microscope observations on the soral zoospores of Synchytrium endobioticum (SCHILB.) PERC.[1])

DOOR

A. P. KOLE

Laboratorium voor Phytopathologie, Landbouwhogeschool, Wageningen

INLEIDING

Naar aanleiding van het werk van MANTON, CLARKE & GREENWOOD (1951), MANTON (1952) en MANTON, CLARKE, GREENWOOD & FLINT (1952) over de structuur van de zweepdraden bij mossen, varens, algen, flagellaten en enkele schimmels (*Saprolegnia*, *Allomyces* en *Olpidium*), werd onderzocht of met de elektronenmicroscoop nadere gegevens konden worden verkregen over de bouw van de zoösporen uit de zomersporangia van *Synchytrium endobioticum*.

WERKWIJZE

Voor het verkrijgen van de zoösporen werd uitgegaan van verse wratten, afkomstig van het aardappelwratziekteonderzoek van de Plantenziektenkundige Dienst.[2]) De wratten werden onder een krachtige waterstraal goed afgespoeld. Vervolgens werden zes wratjes of gedeelten van wratten, ter grootte van $\frac{1}{8}$ tot $\frac{1}{2}$ cm^3, met het snijvlak naar boven, ieder in een druppel gedestilleerd water op een goed gereinigd objectglas gelegd. Na het uitleggen van de wratten begon het onderzoek op de aanwezigheid van zoösporen. Hiertoe werden de wratjes om de vijf minuten naar een druppel water op een volgend objectglas overgebracht. De druppels, waaruit de wratten waren verwijderd, werden dan zonder dekglas met een microscoop bij een objectiefvergroting van 10 × bekeken. Wratjes, die na ongeveer een half uur nog geen zoösporen hadden geproduceerd, werden door nieuwe vervangen. Indien een wratje een goede sporenleverancier bleek te zijn, werd met een micropipetje een druppeltje met zoösporen naar het formvarvliesje van een preparaathouder voor de elektronenmicroscoop overgebracht. De grootte van de druppel werd zo gekozen, dat de spleet in de preparaathouder er juist door werd bedekt. Vervolgens werden de zoösporen gedood en gefixeerd door de preparaathouders ondersteboven gedurende 30 seconden vlak boven een flesje met 2% osmiumzuur te houden. Daarna werden de preparaathouders in de laboratoriumruimte aan de lucht gedroogd. Bij het bekijken van de preparaten met behulp van de fase-contrast microscoop werd een zeer goede voorlopige indruk van hun kwaliteit verkregen. De preparaathouders werden

[1]) Aangenomen voor publikatie 4 december 1957.

[2]) De auteur is aan Ir. H. VAN LOOKEREN CAMPAGNE, Plantenziektenkundige Dienst, veel dank verschuldigd voor het verlenen van gastvrijheid, het verstrekken van materiaal en het geven van waardevolle adviezen bij het maken van de preparaten.

hierbij met het omlaaggebogen lipje naar buiten langs de rand van een objectglas gelegd. De zoösporen met hun zweepdraden, zomede de aanwezigheid van het meest storende element bij het onderzoek, nl. verontreinigingen afkomstig uit de wratten, waren op deze wijze duidelijk te zien. De beste preparaten werden voor het elektronenmicroscopisch onderzoek gebruikt. Ter beschikking stond een Philips elektronenmicroscoop, type voor 100 KV.[1])

RESULTATEN

Uit de verschillende waarnemingen kan het volgende beeld van de bouw van de zoöspore worden geconstrueerd. Het lichaam van de zoöspore is dikwijls, vermoedelijk als gevolg van beginnende desintegratie, niet scherp begrensd (fig. 1). Centraal gelegen vindt men een meer substantiële massa, welke waarschijnlijk in hoofdzaak door de kern wordt gevormd. Excentrisch gelegen bevindt zich een kratervormige opening, afkomstig van een, vermoedelijk bij het prepareren opengesprongen, vacuole. In fig. 1 komt de zweepdraad van onder het lichaam van de zoöspore te voorschijn, waardoor de plaats van aanhechting aan het gezicht wordt onttrokken. In de lengterichting van de zweepdraad ziet men soms, zoals in fig. 1, een zwakke streping. Te rekenen van de blefaroplast, de knopvormige verdikking van de zweepdraad op de plaats van aanhechting, af is de zweepdraad over 4/5 van zijn lengte nagenoeg overal even dik (fig. 2). Het laatste deel is veel dunner; aan het uiteinde bevindt zich soms een knopvormige verdikking (fig. 2, pijl). Behalve de hier beschreven geheel intact zijnde flagellen, werden ook zweepdraden aangetroffen die door desintegratie in vezels uiteenrafelden. In fig. 3, welke, zoals aan de aanwezigheid van twee vacuolen en twee flagellen te zien is, op een zygote betrekking heeft, zijn bij de naar rechts liggende zweepdraad de vezels aan het uiteinde van de zweepdraad waaiervormig gespreid. Een sterkere vergroting (fig. 4) laat zien, dat er in totaal elf vezels in de zweepdraad aanwezig zijn. Van deze elf vezels zijn er negen ongeveer even lang; de overige twee, welke in het midden naast elkaar liggen, zijn wat langer. Van het gedeelte van de centrale vezels, dat buiten de andere uitsteekt, is het uiteinde (beginnende bij de pijl) veel onduidelijker dan de rest. De afzonderlijke vezels in fig. 4 vertonen bij nadere beschouwing, althans in de originele foto, een zwakke overlangse streep. Hieruit zou kunnen worden afgeleid, dat de vezels uit twee componenten zijn opgebouwd.

BESPREKING

Uit het vele onderzoek dat de laatste jaren met behulp van de elektronenmicroscoop is verricht naar de bouw van zweepdraden bij plant en dier is gebleken, dat de zweepdraden zijn opgebouwd uit vezels en dat het aantal en de rangschikking dier vezels waarschijnlijk steeds dezelfde is (voor literatuur zie MANTON, 1953 en KOCH, 1956). In het merendeel der gevallen zijn nl. elf vezels gevonden, waarbij een centraal paar door de overige negen vezels wordt omringd. De vezelbundel wordt door een huid omgeven en in bepaalde gevallen is

[1]) De auteur is Mej. Dra. C. VAN DER SCHEER, Stichting Landbouw Fysisch-Technische Dienst, zeer erkentelijk voor de hulp bij het onderzoek met de elektronenmicroscoop. De Heer S. HENSTRA, eveneens van de S.L.F.T.D., komt een woord van dank toe voor het maken van de foto's.

FIG. 1

FIG. 2

FIG. 1. Een zoöspore met kernmateriaal, een kratervormige holte en een gedeelte van de zweepdraad, waarin een streepvormige tekening is te zien.
A zoospore showing nuclear substance, a crateriform cavity and part of the flagellum with faint longitudinal striation.

FIG. 2. Losgeraakte zweepdraad met een knopvormige verdikking aan het dunne uiteinde.
A detached flagellum with a slight terminal swelling on the end of the whiplash.

FIG. 3. Een zygote met uiteengerafelde zweepdraden.
A zygote showing fibrillar disintegration of the flagella.

FIG. 4. Een vergroting van het uiteinde van de naar rechts wijzende zweepdraad in de vorige foto.
Enlarged view of the flagellar tip at the right in the preceding photograph.

er een spiraalvormige structuur tussen de buitenste vezels en de kern. Dat de vezels zelf een fijnere structuur konden vertonen, was ook reeds uit de literatuur bekend. In tegenstelling met de rangschikking en het aantal vezels welke, zoals vermeld, vermoedelijk steeds dezelfde zijn, blijkt het aantal componenten van de vezels te variëren. MANTON en medewerkers (zie KOCH, 1956) vonden in die gevallen, waarin de vezels een fijnere structuur vertoonden, twee componenten. Bij schimmels is voor het eerst een onderverdeling der vezels gevonden door KOCH (1956). Bij het onderzoek van enkele vertegenwoordigers der Chytridiales kwam hij tot de conclusie, dat de twee centrale vezels waarschijnlijk uit twee componenten bestaan en de negen overige uit meer dan twee, misschien drie. De resultaten van het eigen onderzoek zijn dus in overeenstemming met de bevindingen van MANTON en medewerkers, die niet meer dan twee componenten vonden. De aanwezigheid van een knopvormige verdikking aan het uiteinde der flagellen bij *Synchytrium* is in overeenstemming met hetgeen door MANTON, CLARKE, GREENWOOD & FLINT (1952) bij *Olpidium* werd gevonden. Door KOCH (1956) werd deze verdikking aangetroffen bij een *Chytridium* sp. en in enkele gevallen bij twee andere leden der Chytridiales. De meningen over de bouw van het dunne uiteinde der zweepdraden lopen nogal uiteen (KOCH, 1956). Wat dit betreft sluiten de resultaten van het eigen onderzoek het beste aan bij hetgeen KOCH voor *Rhizophidium sphaerotheca* heeft gevonden, nl. dat het centrale paar vezels tot het uiteinde van de zweepdraad doorloopt, terwijl de negen andere vezels korter zijn en onderling niet dezelfde lengte hebben. Het vaag afgebeelde uiteinde van de centrale vezels stemt overeen met hetgeen MANTON et al. (1952) en KOCH (1956) respectievelijk bij *Olpidium brassicae* en *Rhizophidium sphaerotheca* hebben gevonden. MANTON et al. (1952) schrijven deze „smoke-like prolongations beyond the apparent ends of the strands" toe aan een „much more destructible condition" van de vezels. Wat de kratervormige holte in het lichaam van de zoöspore betreft, deze correspondeert waarschijnlijk met de vacuole waarin zich bij de levende zoöspore een oliedruppel bevindt.

SUMMARY

Electron microscope observations on the soral zoospores of *Synchytrium endobioticum* revealed, besides nuclear substance, the presence of a crateriform cavity in the zoospore body. Probably this cavity corresponds with the vacuole which contains oil in the living zoospore. The flagella are cylindrical and they have a whiplash tip. Faint longitudinal striations can just be detected in some of the flagella. A slight terminal swelling on the end of the whiplash is occasionally found. Several flagella showed fibrillar disintegration. Making eleven fibres in all, there are two long central strands and nine shorter peripheral strands. A fine line running along the centre of some fibres indicates that probably each fibre contains two subfibres.

LITERATUUR

KOCH, W. J., – 1956. Studies of the motile cells of chytrids. I. Electron microscope observations of the flagellum, blepharoplast and rhizoplast. Am. J. Bot. 43: 811–819.

MANTON, I., – 1952. The fine structure of plant cilia. Structural aspects of cell physiology. Soc. exp. Biol. Symp. 6: 306–319.

Manton, I., – 1953. Number of fibrils in the cilia of the green algae. Nature 171: 485.
Manton, I., B. Clarke & A. D. Greenwood, – 1951. Observations with the electron microscope on a species of Saprolegnia. J. exp. Bot. 2: 321–331.
Manton, I., B. Clarke, A. D. Greenwood & E. A. Flint, – 1952. Further observations on the structure of plant cilia, by a combination of visual and electron microscopy. J. exp. Bot. 3: 204–215.

T. Pl.ziekten 63 (1957): 365–368

EEN WAARNEMING OVER HET VOORKOMEN VAN FYSIOLOGISCHE RASSEN VAN HET AARDAPPELCYSTENAALTJE, WELKE ZICH STERK KUNNEN VERMEERDEREN IN RESISTENTE NAKOMELINGEN VAN *SOLANUM TUBEROSUM* SUBSP. *ANDIGENA*[1])

With a summary: A record of the existence of physiologic races of the potato root eelworm, which multiply vigorously in resistant progeny of Solanum tuberosum subsp. andigenum

DOOR

P. A. VAN DER LAAN

Laboratorium voor Toegepaste Entomologie, Amsterdam

en

C. A. HUIJSMAN

Stichting voor Plantenveredeling, Wageningen

De meest belovende, directe bestrijdingswijze van het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* WOLL.) is gelegen in de verbouw van resistente aardappelrassen. Zowel in Engeland (ELLENBY, 1948) als in Nederland (TOXOPEUS & HUIJSMAN, 1952, 1953) zijn belangrijke vorderingen op dit gebied gemaakt. Onlangs is een overzicht van het in Nederland verrichte onderzoek verschenen (HUIJSMAN, 1957). De hoogste graad van resistentie werd gevonden in enkele lijnen van *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* JUZ. et BUK.[2]), welke de basis hebben gevormd van een uitgebreid kweekprogramma voor het verkrijgen van cultuurrassen, resistent tegen de aardappelmoeheid.

Natuurlijk heeft men reeds bij de aanvang van dit onderzoek rekening gehouden met de mogelijkheid, dat er fysiologische rassen van de parasiet zouden bestaan – of door mutatie zouden kunnen ontstaan – welke zich sterk kunnen vermeerderen in het gebruikte resistente materiaal.

Het genencentrum van de aardappel ligt in Zuid-Amerika (Peru, Bolivia, Noord-Argentinië). Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat ook het genencentrum van het aardappelcystenaaltje in deze gebieden is gelegen. Indien deze veronderstelling juist is, zou de variabiliteit van het aaltje daar groter kunnen zijn dan in de van Zuid-Amerika uit besmette gebieden in West-Europa. WILLE & BAZAN DE SEGURA (1952) vonden, dat het aardappelcystenaaltje zeer talrijk aanwezig is in de landbouwgebieden van de Andes.

In 1953 onderzocht de eerste auteur[3]) de mogelijkheden van biologische bestrijding van het aardappelcystenaaltje, waarbij vooral schimmelsoorten, welke de cysten binnendringen en de eieren in de cysten vernietigen, de bijzondere aandacht vroegen (VAN DER LAAN, 1956). Daar de kans op ontdekking van

[1]) Aangenomen voor publikatie 4 december 1957.

[2]) Kortheidshalve verder *S. andigenum* genoemd.

[3]) Toen werkzaam bij de Werkgroep Onderzoek Bestrijding Aardappelcystenaaltje T.N.O.

natuurlijke vijanden van een schadelijk dier het grootst is in het land van oorsprong, werd een verzoek gericht aan Ing. C. Bazan de Segura een hoeveelheid cysten uit Peru (Huancayo) te zenden. Hieruit werden inderdaad enkele parasitaire schimmelsoorten geïsoleerd.

Het leek tevens van belang na te gaan of de resistente aardappelrassen, afgeleid van de resistente *andigenum*-nummers, zouden worden aangetast door de aaltjes uit Peru. In juni 1953 werd daartoe een kleine potproef ingezet. Met de cysten uit Peru werd zeer zorgvuldig omgegaan, zodat geen enkele aan de aandacht kon ontsnappen. De proef geschiedde op het terrein van het Laboratorium voor Phytopathologie te Wageningen in een kas, die speciaal voor het onderzoek met het aardappelcystenaaltje was gebouwd.

Veertien potten met een diameter van 16 cm werden gevuld met tuinaarde. Acht dezer potten kregen 50 cysten uit Peru per pot; zes kregen 50 cysten van een Nederlandse herkomst. In deze potten werden bewortelde stekken van resistente en vatbare planten van kruisingen van *andigenum* × *tuberosum* geplant (tabel 1).

Tabel 1. Afstamming van het in de proef gebruikte plantmateriaal.
Origin of the plant material used in the experiment.

A 8: Maritta	× 1673–24
A 9: Prof. Wohltman	× 1685–15
A 11: Furore	× 1673–11
A 13: Sirtema	× 1673–5
A 6: Record	× 1673–1
TA 17: Sirtema	× 1673–15

De nummers 1673 en 1685 zijn afkomstig van de Commonwealth Potato Collection te Cambridge.
The numbers 1673 and 1685 originate from the Commonwealth Potato Collection at Cambridge.

Na afloop van de groeiperiode werd de inhoud van alle potten onderzocht; de gehele potinhoud werd opgespoeld in een gewijzigd Fenwick-apparaat. De aantallen cysten, welke per pot werden gevonden, zijn in tabel 2 vermeld.

Op de vatbare planten was een vermeerdering te constateren, zowel van de

Tabel 2. Totaal aantal cysten per pot, geïsoleerd in oktober/november. Het oorspronkelijke aantal cysten was 50 per pot.
Total number of cysts per pot, found in October–November. The original number of cysts per pot was 50.

	Cysten uit Peru *Peruvian cysts*					Cysten uit Nederland *Dutch cysts*		
Resistent plantmateriaal *Resistant plant material*	A 13	A 11	A 6	A 11	A 9	A 11	A 6	A 8
Aantal cysten *Number of cysts*	135	89	144	99	59	49	49	59
Vatbaar plantmateriaal *Susceptible plant material*	TA 17		TA 17	TA 17		TA 17	TA 17	TA17
Aantal cysten *Number of cysts*	259		76	ca. 225		378	361	475

uit Peru als van de uit Nederland afkomstige cysten. Bij de met cysten uit Peru geïnfecteerde resistente planten werd echter eveneens een vermeerdering gevonden. Sommige van de nieuw gevonden cysten waren klein en loos, maar de meeste bevatten normaal ontwikkelde eieren met larven van het tweede stadium.

De resistente planten in de potten, besmet met cysten, afkomstig van een perceel in Nederland (Noordwijk), vertoonden met de in deze proef gebruikte techniek geen aantoonbare vermeerdering, behalve in één pot, waar enige kleine, nieuwe cysten werden gevonden.

Uit deze proef volgt dat er sterke aanwijzingen zijn voor het voorkomen in Peru van een agressiever fysiologisch ras van het aardappelcystenaaltje. Nadat de resultaten van deze proef bekend waren geworden, zijn onmiddellijk alle gebruikte potten met grond en verder materiaal vernietigd, om verspreiding van dit gevaarlijke ras te voorkomen.

Het onderzoek werd in Peru voortgezet; door bemiddeling van Dr. H. J. Toxopeus (Instituut voor Veredeling van Landbouwgewassen) konden 80, in Nederland resistent bevonden zaailingen aldaar op resistentie worden getoetst. Dit waren alle nakomelingen van C.P.C. 1673. De proeven werden uitgevoerd door Ir. Simon (Estacion Experimental Agricola de La Molina, Lima) in potten met geïnfecteerde grond van Maco farm, prov. Tarma (Quevedo et al., 1956; Huijsman, 1957) Het resultaat was, dat alle zaailingen, die dus in Nederland resistent waren bevonden, zwaar werden aangetast. In Peru komt dus op minstens twee plaatsen (Huancayo en Maco farm, prov. Tarma) een fysiologisch ras van *Heterodera rostochiensis* voor, dat afwijkt van het in Nederland gevonden ras. Deze uitkomst bevestigde de boven beschreven proef.

Sindsdien zijn ook in Engeland en Nederland op verschillende plaatsen populaties van het aardappelcystenaaltje gevonden, die de resistentie breken (Dunnett, 1956; Jones, 1957; Huijsman, niet gepubliceerd).

SUMMARY

Growing resistant potato varieties seems to be the most promising way of direct control of the potato root eelworm. A few clones of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* showed a high degree of resistance (Ellenby, 1948; Toxopeus & Huijsman, 1953). However, development of resistance-breaking physiologic races is a threat to each resistance breeding programme.

Since it is found that the potato root eelworm occurs frequently in the native potato crops in the Andes region (Wille & Bazan de Segura, 1952), it seems highly probable that this pest had its origin in South America. Variability of *Heterodera rostochiensis* may be larger there, than in the European countries, which are infested from South America. Senora Bazan de Segura was asked to send cysts from Peru (Huancayo) and these were used to investigate whether potato varieties of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, resistant to attack by the potato root eelworm present in the Netherlands, would also resist attack of the eelworm from Peru.

In June 1953 a small pot experiment was started in a greenhouse, specially built for research with the potato root eelworm and from which no cysts could escape. Fourteen pots of 16 cm diameter were filled with garden soil. Eight pots received 50 Peruvian cysts per pot, and six pots 50 cysts of Dutch origin per pot. Cuttings of resistant *andigenum* varieties were planted in five pots containing

Peruvian cysts and three pots containing Dutch cysts. Cuttings of susceptible *andigenum* varieties were planted in three pots containing Peruvian cysts and three pots containing Dutch cysts (table 1).

At the end of the growth period the pots were investigated, the whole contents of each pot being floated through a modified Fenwick-apparatus. Table 2 gives the number of cysts found per pot.

New cysts were produced on the susceptible varieties by both Peruvian and Dutch cyst populations, and on resistant varieties in pots infected with Peruvian cysts. Some of the newly-formed cysts were small or empty, but most of them contained normally developed eggs with second instar larvae.

The resistant varieties in pots infected with Dutch cysts showed no development of new cysts but in one case a few small non-viable cysts were found.

The results of this experiment strongly suggest that the Peruvian race of *Heterodera rostochiensis*, used in this experiment, breaks resistance of the varieties bred in the Netherlands.

After this experiment, done on a very small scale, all materials used, were carefully destroyed, to avoid spreading nematodes of Peruvian origin.

Further experiments were done in Peru by QUEVEDO et al. Eighty seedlings which proved to be resistant in the Netherlands, were tested against *Heterodera rostochiensis*. All seedlings appeared to be highly susceptible to a race occurring at Maco Farm, prov. Tarma, Peru.

Recently, resistance-breaking races of *Heterodera rostochiensis* have also been found in Great Britain (DUNNETT, 1957; JONES, 1957) and in the Netherlands (HUIJSMAN, unpublished).

LITERATUUR

DUNNETT, J. M., – 1957. Variation in pathogenicity of the potato root eelworm (Heterodera rostochiensis Woll.) and its significance in potato breeding. Euphytica 4: 77–89.

ELLENBY, C., – 1948. Resistance to the potato-root eelworm. Nature 162: 704.

HUIJSMAN, C. A., – 1957. Veredeling van de aardappel op resistentie tegen Heterodera rostochiensis Woll. Diss. Wageningen.

JONES, F. G. W., – 1957. Resistance-breaking biotypes of the potato root eelworm (Heterodera rostochiensis WOLL.). Nematologica 2: 185–192.

LAAN, P. A. VAN DER, – 1956. Onderzoekingen over schimmels, die parasiteren op de cysteinhoud van het aardappelcystenaaltje (Heterodera rostochiensis Woll.). T. Pl. ziekten 62: 305–321.

QUEVEDO, A., J. E. SIMON & H. J. TOXOPEUS, – 1956. Estudios de resistencia a la „anguilula dorada" de la papa. Inf. Mens. Est. Exp. Agr. (Lima): 347.

TOXOPEUS, H. J. & C. A. HUIJSMAN, – 1952. Genotypical background of resistance to Heterodera rostochiensis in S. tuberosum var. andigenum. Nature 170: 1016–1017.

TOXOPEUS, H. J. & C. A. HUIJSMAN, – 1953. Breeding for resistance to the potato root eelworm. I. Preliminary data concerning the inheritance and the nature of resistance. Euphytica 2: 180–186.

WILLE, J. E. & C. BAZAN DE SEGURA, – 1952. La Anguilula dorada, Heterodera rostochiensis, una plaga del cultivo de las papas, recien descubierta en el Peru. Min. Agric. (Peru) Boletin 48: 1–47.

T. Pl.ziekten 63 (1957): 369–374

KURKWORTELVERSCHIJNSELEN VAN TOMAAT, VEROORZAAKT DOOR EEN STERIEL MYCELIUM. II[1])

With a summary: Corky root of tomato caused by a sterile mycelium. II

DOOR

G. P. TERMOHLEN[2])

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

INLEIDING

De reeds in de jaren dertig bekende kurkwortel is de meest gevreesde ziekte van de tomaat. Uit de literatuur blijkt, dat meermalen een steriel mycelium uit tomatewortels met kurkwortel is geïsoleerd (WILLIAMS, 1929; ANONYMUS, 1939; RICHARDSON & BERKELEY, 1944; GRAM & WEBER, 1944; EBBEN, 1950; ANONYMUS, 1954; EBBEN & WILLIAMS, 1956). Slechts RICHARDSON & BERKELEY meenden de oorzaak van kurkwortel primair aan de door hen onderzochte steriele schimmel te moeten toeschrijven. ANONYMUS (1954) vermeldt, dat een steriel mycelium misschien de veroorzaker van kurkwortel is. NOORDAM, TERMOHLEN & THUNG (1957) maakten waarschijnlijk, dat een steriel mycelium kurkwortel teweegbrengt. Voortgezet onderzoek heeft deze veronderstelling bevestigd en tevens een verklaring gegeven voor het feit, dat in vroegere onderzoekingen niet vaker een steriel mycelium als primaire oorzaak van kurkwortel werd gevonden.

ZIEKTEBEELD

Kurkwortel kan zowel op zandgrond, als op veen- of kleigrond in elke graad van hevigheid worden aangetroffen. Het is vrijwel niet mogelijk een bedrijf te vinden, waar de ziekte niet voorkomt, tenzij in het jaar, direct voorafgaande aan de teelt, een zorgvuldige grondontsmetting is toegepast.

In het ziektebeeld kunnen in hoofdzaak twee typen worden onderscheiden. Het meest voorkomende beeld is het optreden van bruin gekleurde verdikkingen met kurklijsten op gedeelten of over de gehele lengte van de wortel (DE MOS, 1954; TERMOHLEN, 1956). Bij het tweede beeld ontbreken deze verdikkingen en typische kurklijsten en worden de wortels geheel of gedeeltelijk donkerbruin gekleurd. Niet zelden kan men de schors van de wortels afschuiven (NOORDAM, TERMOHLEN & THUNG, 1957, fig. 2 en 3). Soms wordt een derde type aantasting gevonden, waarbij een bruinkleuring optreedt en kurklijsten worden gevormd aan het basale gedeelte van de stengel, even boven en onder de grondoppervlakte.

Het eerste type wordt overwegend op de zwaardere gronden aangetroffen, het tweede type komt meer op de lichtere gronden voor. Het loslaten van de schors wordt voornamelijk op de nattere gronden gevonden. Enerzijds houdt dus het optreden van verdikkingen met kurklijsten verband met het grond-type, anderzijds met de waterhuishouding van de grond. De bruinkleuring is een

[1]) Aangenomen voor publikatie 2 december 1957.

[2]) Gedetacheerd bij het Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder Glas te Naaldwijk.

verkurking als reactie op de aantasting door het steriele mycelium, dat als primaire oorzaak van kurkwortel moet worden beschouwd. Afhankelijk van de uitwendige omstandigheden kunnen secundaire bodemorganismen het afstervingsproces van de wortels versnellen.

Behalve tomaat kunnen ook andere Solanaceeën worden aangetast. Dit is waargenomen bij paprika, spaanse peper, aubergine, doornappel en zwarte nachtschade. De aantasting is echter op dezelfde besmette grond het hevigst bij tomaat. Kurkwortel bij de andere gewassen wordt ook door het steriele mycelium veroorzaakt.

SCHIMMELS, GEÏSOLEERD UIT TOMATEWORTELS MET KURKWORTEL EN INFECTIEPROEVEN MET DEZE SCHIMMELS

In vroegere onderzoekingen zijn behalve een steriel mycelium tal van andere bodemschimmels uit zieke wortels geïsoleerd. Kenmerkend hierbij was, dat de meeste andere schimmels veelvuldiger voorkwamen dan de steriele schimmel. EBBEN & WILLIAMS (1956) noemen behalve een steriel mycelium o.a. *Colletotrichum atramentarium*, *Volutella ciliata*, *Cephalosporium*-soorten en *Chaetomium cochlioides*, terwijl RICHARDSON & BERKELEY (1944) naast een steriel mycelium voornamelijk *Trichoderma*-, *Fusarium*-, *Cylindrocarpon*- en *Pythium*-soorten vinden. Zowel EBBEN & WILLIAMS als RICHARDSON & BERKELEY deden infectieproeven; alleen laatstgenoemden hebben de vijf schimmels in alle combinaties in hun proeven betrokken en komen tot de conclusie dat slechts aantasting wordt verkregen als het steriele mycelium in het object voorkomt.

Uit ons onderzoek is gebleken, dat de ontsmettingsmethodiek bepalend is voor de mate, waarin het steriele mycelium uit aangetaste wortels kan worden geïsoleerd. RICHARDSON & BERKELEY ontsmetten de wortelstukjes in leidingwater, EBBEN & WILLIAMS deden dit achtereenvolgens in alcohol 96% en calciumhypochloriet 7%. Wij hebben ontsmet in alcohol 75% en sublimaat $1^0/_{00}$, afhankelijk van de dikte der wortelstukjes respectievelijk tien tot dertig seconden en één tot vijf minuten. Hierna werd tien minuten gespoeld in leidingwater.

Laatstgenoemde ontsmetting is ongeveer even sterk als die, toegepast door EBBEN & WILLIAMS. Naarmate zwakker wordt ontsmet, worden de verscheidenheid der geïsoleerde schimmels en de bacterie-verontreiniging groter. De groei van het steriele mycelium is langzaam in verhouding tot de groei der andere geïsoleerde schimmels. Hierdoor wordt het bij een te zwakke ontsmetting gemakkelijk door andere organismen overgroeid. Bij een te sterke ontsmetting wordt de groei van de zich oppervlakkiger bevindende schimmels weliswaar onderdrukt, doch ook het steriele mycelium wordt dermate beschadigd, dat het niet kan worden geïsoleerd. Door het toepassen van een middelmatig sterke ontsmetting, wordt een te grote verscheidenheid van schimmels vermeden, terwijl het steriele mycelium een voldoend aantal malen kan worden geïsoleerd om conclusies omtrent de oorzaak van kurkwortel te rechtvaardigen. Hiermede is waarschijnlijk ook de oorzaak aangegeven, waarom niet eerder in hoofdzaak een steriel mycelium uit zieke wortels is geïsoleerd.

Met hulp van de assistenten van de Voorlichtingsdienst zijn in het Zuidhollands Glasdistrict 132 monsters van „kurkwortel" verzameld. Per monster zijn gemiddeld 20 wortelstukjes (elk ongeveer 1 cm lang), verdeeld over vier

petrischalen op kersagar uitgelegd. Uit de stukjes groeien verscheidene typen steriele mycelia; de grijze kleur en de groeiwijze zijn verschillend.

Tabel 1 vermeldt het resultaat van de isolatie-proeven; in deze tabel zijn de typen steriele grijze schimmels tot één groep verenigd.

TABEL 1. Isolaties uit verkurkte wortels.[1])
Isolates from corky roots.[1])

aantal monsters *number of samples*	aantal stukjes *number of pieces*	steriele grijze mycelia *sterile grey mycelia*		andere schimmels *other fungi*		negatief[2]) *negative*	
		aantal *number*	%	aantal *number*	%	aantal *number*	%
132	2603	2097	67,5	525	17	483	15,5

[1]) Uit één stukje groeiden soms verschillende schimmels.
Sometimes different fungi grew from one piece.
[2]) Geen groei, of alleen groei van bacteriën.
No growth at all, or only bacterial growth.

Indien bij de berekening van de percentages de laatste kolom buiten beschouwing wordt gelaten, zijn de percentages voor „steriele grijze mycelia" en „andere schimmels" respectievelijk 80 en 20. Van de „andere schimmels" kunnen o.a. worden genoemd: *Cylindrocarpon radicicola*, *Colletotrichum atramentarium*, *Cephalosporium longisporum*, *Fusarium*- en *Rhizoctonia*-soorten. Dr. J. A. VON ARX te Baarn was zo welwillend deze schimmels te determineren.

Infectieproeven zijn gedaan met 88 isolaties van steriele grijze mycelia en met 39 isolaties van andere schimmels, waaronder alle gedetermineerde. In beide groepen kwamen verscheidene, op het oog identieke schimmels voor. Combinaties van schimmels zijn niet gemaakt. Elke schimmel is op vier petrischalen kersager gedurende twee tot drie weken bij 24 °C gekweekt en daarna gemengd met steriele grond, die over drie potjes van elk 250 ml is verdeeld. De tomatewortels zijn acht weken na het poten van de planten beoordeeld. Alleen met de steriele grijze mycelia zijn kurkwortelsymptomen verkregen. Het is gelukt deze schimmels te herisoleren. Daartoe werden de dunne worteltjes uit deze potproeven zwakker ontsmet (enkele seconden alcohol en 30 tot 60 seconden sublimaat). Het percentage was gelijk aan óf iets lager dan dat in tabel 1 vermeld. Het percentage andere schimmels was zeer klein.

Behalve infectieproeven in grond, die kunstmatig met schimmel is besmet, zijn overeenkomstige proeven genomen met besmette grond uit de praktijk en met grond, besmet met tot poeder gemalen verkurkte wortels. De ziekteverschijnselen zijn steeds dezelfde. De wortels zijn bruin gespikkeld. De eerste symptomen zijn na drie tot vier weken zichtbaar. Met de duur van de proef neemt de bruinkleuring toe en worden de bruine vlekjes groter. Onder de binoculaire loupe zijn niet zelden geringe verdikkingen met kurklijstjes waar te nemen. Een hevig aangetast wortelgestel heeft minder fijne wortels dan de gezonde controle in gestoomde grond, terwijl wortelharen dikwijls geheel ontbreken (NOORDAM, TERMOHLEN & THUNG, 1957, fig. 1).

Tussen de drie genoemde infectiemethoden bestaan slechts verschillen in

mate van aantasting. Deze verschillen zijn afhankelijk van de hoeveelheid inoculum en van de pathogeniteit van de schimmel.

HET STERIELE MYCELIUM

De bij 24 °C op kersagar gekweekte schimmel vormt geen sporen, heeft een grijze kleur en groeit langzaam. Soms worden microsclerotiën gevormd. Door het Centraal Bureau voor Schimmelcultures te Baarn kon de schimmel nog niet worden gedetermineerd.

Binnen de isolaties van het grijze steriele mycelium kunnen ongeveer 10 typen worden onderscheiden. Het is nog niet duidelijk of deze als zodanig in de grond aanwezig zijn, of dat ze onder invloed van uitwendige omstandigheden (b.v. kweken op kunstmatige voedingsbodem) ontstaan. Opvallend is wel de waarneming, dat meermalen uit één wortelstukje twee typen groeien, die elk steriel en constant zijn. Alle typen gaven in infectieproeven kurkwortelsymptomen. Soms kwamen vrij grote pathogeniteitsverschillen naar voren, zowel tussen schimmels van één type, als tussen schimmels van verschillend type.

Het mycelium van een zeven dagen oude cultuur is dikwijls lichtgrijsgroen; de rand is wit. Het oudere mycelium heeft een grijze kleur. Het mycelium vormt een dichte, meestal effen mat, tot ongeveer 4 mm van de voedingsbodem omhoog komend. De onderkant van de cultuur is meestal groenzwart gekleurd, soms bruinzwart. De verschillende typen worden o.a. gekenmerkt door een verschillende kleur grijs, doch donker-grijs overheerst. Bij één der licht-grijze isolaties verschijnt in het oudere mycelium een paarsrose kleur. Dit type komt volgens de beschrijving overeen met het steriele mycelium, dat RICHARDSON & BERKELEY (1944) hebben geïsoleerd.

De snelste groeiers beslaan in twee tot drie weken de oppervlakte van een petrischaal van 10 cm, de langzaamste ongeveer 50 % van deze oppervlakte. De schimmel met de paarsrose kleur in het mycelium groeit langzaam en is door ons, na een donker-grijs sneller groeiend type, het meest geïsoleerd. De groei is maximaal tussen 23° en 27 °C en neemt sterk af boven 30 °C en beneden 15 °C.

Jong mycelium is 2 tot 4 μ dik, zeer weinig gesepteerd en betrekkelijk weinig vertakt. Soms liggen een aantal hyfen dicht opeengepakt en vormen een soort koord (fig. 1). Het oudere mycelium is donker gekleurd, niet zelden veelvuldig gesepteerd en ook sterker vertakt. Het doet denken aan kettingen van tamelijk dunwandige chlamydosporen (fig. 2). Deze cellen kunnen rond zijn (7 tot 10 μ), langwerpig (breedte 3 tot 8 μ; lengte 10 tot 18 μ), of onregelmatig van vorm. Zeer waarschijnlijk is dit een inleidende fase tot de vorming van microsclerotiën, die in verscheidene culturen zijn waargenomen (fig. 3). De sclerotiën zijn zwart en kunnen in grootte van ongeveer 100 μ tot ongeveer 400 μ variëren; ze zijn rond tot onregelmatig van vorm. In een twee tot drie weken oude cultuur zijn ze met het blote oog te zien.

SAMENVATTING

Bevestigd werd, dat een steriel mycelium de primaire oorzaak van kurkwortel is. Van het aantal uit zieke wortels geïsoleerde schimmels was ongeveer 70 % steriel. Het is zonder verder onderzoek niet mogelijk uit te maken of de groep

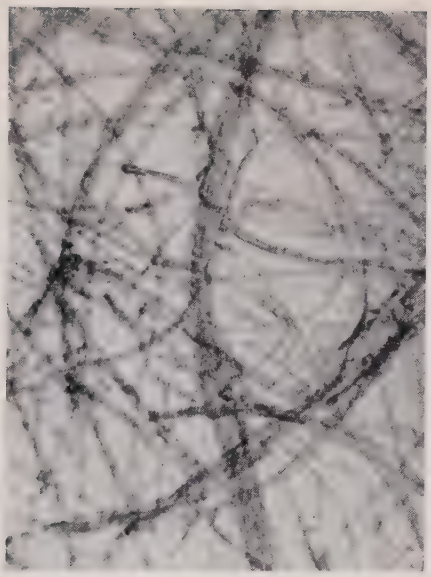


FIG. 1. Koorden van dicht opeengepakte hyfen, 150 ×.
Strands of parallel hyphae, × 150.

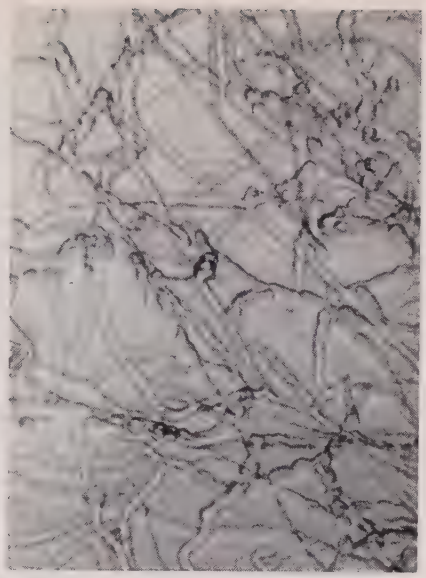


FIG. 2. Dunne hyfen en kettingen van donkerder gekleurde kortere cellen, 150 ×.
Thin hyphae and chains of darker coloured closely septate cells, × 150.

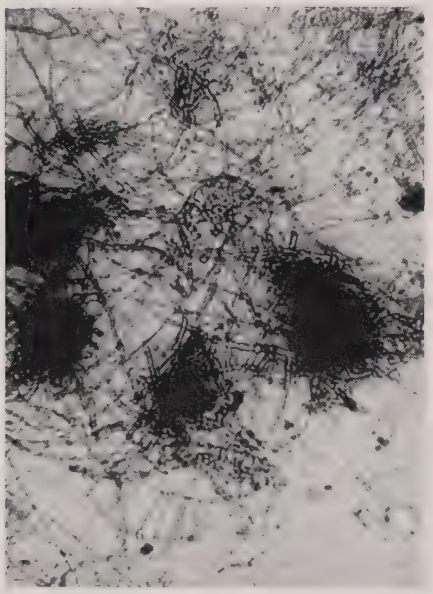


FIG. 3. Microsclerotiën, 100 ×.
Microsclerotia, × 100.

Foto's Proefstation Naaldwijk

„steriel mycelium" bestaat uit afzonderlijke steriele typen. De mate van ontsmetting van de wortelstukjes bepaalt het aantal malen dat steriel mycelium wordt geïsoleerd.

Hoewel secundaire bodemorganismen het afstervingsproces van de wortels kunnen versnellen, moeten de verschillende ziektebeelden, die in de praktijk worden aangetroffen, aan dezelfde primaire oorzaak worden toegeschreven.

SUMMARY

The disease occurs on every soil-type. The most common symptoms on heavier soils are thickened corky roots. On light soils the roots are frequently for the greater part brown without the typical corky appearance; sometimes the cortex loosens. This may also be the case on wet heavy soils.

The primary cause of the disease is a sterile mycelium. Secondary soil organisms may accelerate the disorganisation of the roots.

Isolation experiments pointed out that 70 % of the isolates grown from diseased roots, consist of a sterile fungus. Pieces (1 cm) of diseased roots were disinfected successively in alcohol 75 % and mercuric chloride 1‰, depending on the thickness of the root 10 to 30 seconds and 1 to 5 minutes respectively, and afterwards they were washed in running water.

In inoculation experiments 127 isolates have been used, including 88 isolates of sterile mycelia and 39 isolates of other fungi. Several fungi of both groups were identical. All fungi were grown on cherry agar in petri dishes for three weeks at 24 °C and mixed with steamed soil in 250 ml clay pots. Tomatoes were planted in these pots and after eight weeks the roots were scored. Inoculation experiments were successful only with the sterile type fungi. Young roots showed brown patches. The older ones were partly or mostly brown with sometimes the beginning of a corky appearance. The fungus could easily be re-isolated from diseased roots. Control plants in steamed soil showed no sign of infection.

Within the sterile group, about 10 strains could be distinguished, differing in growth rate and colour. Differences in pathogenicity occurred not only between fungi of one type, but also between fungi of different types.

The fungus is non-sporulating, dark-coloured and slow-growing. So far it could not yet be determined at the Centraal Bureau voor Schimmelcultures at Baarn, the Netherlands.

Aerial mycelial growth is tight-cottony, mostly smooth and raised to 0.4 cm above the surface of the medium. The colour of the mycelium varies from light to dark gray; in some light gray isolates the mycelium is tinted with subdued pink-purple.

The reverse of the colony varies from grayish-green to greenish-black and is sometimes dark brown. More than once different „colour-types" grew from one piece of disinfected root.

Young mycelium is 2 to 4 μ thick, sparcely branched, with very few septae. Sometimes the mycelium forms strands of parallel hyphae (fig. 1). Apart from the thin hyphae one could find (with increasing age of the culture) closely septate, more branched, thicker hyphae. The cells are oval (7 to 10 μ), oblong (3 to 8 μ × 10 to 8 μ), or irregularly shaped and look somewhat like chlamydospores (fig. 2). To some extent this description is in agreement with the one given by Richardson & Berkeley (1944). They do not mention microsclerotia.

Those chlamydospore-like cells probably are the beginning of the formation of microsclerotia, which could be found in several cultures after two to three weeks. The sclerotia are black and vary from 100 to 400 μ (fig. 3).

LITERATUUR

ANONYMUS, – 1939. Kurkwortel bij tomaten. Jaarverslag Proeftuin Z.H. Glasdistrict Naaldwijk, 1938: 34–35.

ANONYMUS, – 1954. Leaflet 384/11–54, Rijksstation voor Plantenziekten, Gent.

EBBEN, M. H., - 1950. Brown root rot of the tomato. Rep. Exp. Res. Sta. Cheshunt, 1949: 28–32.

EBBEN, M. H. & P. H. WILLIAMS, – 1956. Brown root rot of tomatoes I. The associated fungal flora. Ann. appl. Biol. 44: 425–436.

GRAM, E. & A. WEBER, – 1944. Plante sygdomme. Kopenhagen.

MOS, D. DE, – 1954. Kurkwortel in tomaten. Groenten en Fruit 10: 242.

NOORDAM, D., G. P. TERMOHLEN & T. H. THUNG, – 1957. Kurkwortelverschijnselen van tomaat, veroorzaakt door een steriel mycelium. T. Pl. Ziekten 63: 145–152.

RICHARDSON, J. K. & G. H. BERKELEY, – 1944. Basal rot of tomato. Phytopath. 32: 615–621.

TERMOHLEN, G. P., – 1956. Kurkwortel, de meest gevreesde tomatenziekte. Groenten en Fruit 12: 605–606.

T. Pl.ziekten 63 (1957): 375–379

KUNSTMATIGE BESMETTING VAN HAVER MET STUIFBRAND, *USTILAGO AVENAE* (PERS.) JENS.[1])

With a summary: Artificial contamination of oats with loose smut, Ustilago avenae (PERS.) JENS.

DOOR

J. A. J. VEENENBOS en T. W. BRANDSMA
Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen

INLEIDING

Voor het toetsen van de fungicide werking van zaadontsmettingsmiddelen voor granen op basis van een organische kwikverbinding wordt onder meer haverstuifbrand gebruikt. Dit betekent, dat er elk jaar een partijtje haver aanwezig moet zijn, waarvan mag worden verwacht, dat de zaden voor een belangrijk percentage met stuifbrand zijn besmet. Voorheen werd dit zaad uit de praktijk verkregen. De laatste jaren bleek het echter niet meer mogelijk nog een perceel haver te vinden met veel brandpluimen. Bovendien was in de nateelt van een dergelijk perceel het percentage brandpluimen veelal zó gering (ca. 0,1 %), dat een betrouwbare conclusie omtrent de fungicide eigenschappen van de te onderzoeken middelen niet mogelijk was.

In verband hiermee werd gezocht naar een eenvoudige en doeltreffende methode om haver kunstmatig met stuifbrand te besmetten, opdat haverstuifbrand als toetsobject bij het onderzoek zou kunnen worden gehandhaafd. Dit onderzoek is van betekenis, omdat de schimmel door ontsmettingsmiddelen met een gering doordringend vermogen onvoldoende wordt bestreden. De infectie komt namelijk tot stand via mycelium of sporen, die zich tussen het kafje en het zaadje bevinden. Haverstuifbrand – hoewel geen ziekte van groot economisch belang – kan dus gegevens verschaffen omtrent de eigenschappen van het middel.

WERKWIJZE

Met het onderzoek werd in 1956 begonnen. In 1957 werden de proeven herhaald. In het jaar voorafgaande aan het jaar van onderzoek werden in de praktijk door stuifbrand aangetaste haverpluimen verzameld. Alvorens met de kunstmatige besmetting te beginnen, werd de kiemkracht van de sporen bepaald. Daartoe werden gepelde haverkorrels gedoopt in een suspensie van de te onderzoeken sporen, waarna de zaden op vochtig filtreerpapier werden uitgelegd en bij 24 C bewaard. Na 42 uur werden de sporen voorzichtig van de zaden gewassen en werd onder de microscoop het percentage gekiemde sporen bepaald. Dit bedroeg in 1956 10% en in 1957 38 %.

[1]) Aangenomen voor publikatie 4 december 1957.

De onderstaande besmettingsmethoden werden beproefd:

I. Methode van HAARRING (1930). In een exsiccator werden achtereenvolgens gebracht 500 ml voedingsoplossing, 1 g stuifbrandsporen en 250 g haver. De voedingsoplossing bevatte per liter gedestilleerd water 1 g druivesuiker, 1 g NaCl, 1 g $CaCl_2$, 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 2 g K_2SO_4 en 2 g KH_2PO_4. De exsiccator werd 10 minuten lang aangesloten op een luchtzuigpomp, die de luchtdruk deed dalen tot ca. 1 cm kwikdruk. Voor en tijdens het afzuigen van de lucht werd de exsiccator enige malen geschud, teneinde de luchtbellen tussen de zaden en tussen zaad en kaf te laten ontwijken en de sporensuspensie homogeen te houden. Vervolgens werd de haver uit de exsiccator gehaald en snel gedroogd.

Het principe van deze „natte vacuüm-methode" is, dat de lucht, die tussen de kafjes en het zaadje zit, wordt verwijderd en de sporensuspensie de gelegenheid krijgt tot deze plaats door te dringen.

II. Dezelfde methode als onder I, doch met leidingwater in plaats van een voedingsoplossing.

III. Volgens een mondelinge mededeling uit Zweden zou ook een „droge vacuüm-methode", waarbij de zaden in een exsiccator worden gedaan zonder toevoeging van een vloeistof, een zware besmetting kunnen veroorzaken. Aan 1 kg zaad werden door ons 4 g sporen toegevoegd. Daarna werd de luchtzuigpomp gedurende tweemaal 10 minuten in werking gesteld, onderbroken door een korte periode waarin weer lucht werd toegelaten.

IV. Methode van PONCHET (1955). Gedurende 6 of 12 uur werd 500 g haver geweekt in 1 l sporensuspensie, die 4 g sporen per liter leidingwater bevatte. Daarna werd het zaad òf direct gedroogd òf eerst nog 20, 40 of 60 uur op filtreerpapier bewaard en daarna gedroogd.

Volgens genoemde onderzoeker is het gebruik van een luchtzuigpomp niet nodig, omdat bij langdurige onderdompeling van de zaden, de kafjes gaan wijken. Hierdoor kan de lucht tussen het zaadje en het kafje ontsnappen en de sporensuspensie binnendringen.

Het bewaren van het zaad op vochtig filtreerpapier had tot doel de sporen reeds op dat tijdstip de gelegenheid te geven te kiemen, omdat dit ook bij de natuurlijke besmetting van het zaad in de praktijk het geval kan zijn.

V. In navolging van PONCHET werd de onder IV beschreven methode enigszins gewijzigd. Het zaad werd niet ondergedompeld in een sporensuspensie, doch gedurende een gelijk aantal uren voorgeweekt in leidingwater en vervolgens goed vermengd met droge sporen (4 g sporen per kg zaad), nadat eerst de vloeistof was afgegoten. Daarna werd het zaad snel gedroogd, dan wel 20, 40 of 60 uur op filtreerpapier bewaard en ten slotte gedroogd.

VI. De droge sporen en het droge zaad werden grondig gemengd, zonder dat van een exsiccator gebruik werd gemaakt.

Zowel in 1956 als in 1957 vond de besmetting volgens de zes beschreven methoden eind februari plaats. Er werd gewerkt bij kamertemperatuur (16 tot 20 °C). De sporen waren afkomstig van brandpluimen uit het ras Marne. Dit was ook het ras, waarmede de proeven werden genomen. Een bepaling van de kiemkracht van het zaad wees uit, dat deze door geen van de behandelingen nadelig was beïnvloed.

Alle monsters werden uitgezaaid op het proefveld van de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen. In 1956 werd gezaaid op 19 maart en in 1957 op

7 maart. De ervaring heeft namelijk geleerd, dat bij vroeg zaaien de infectiekansen groter zijn. Per object werd 125 g haver uitgezaaid. Aangezien het proefveld gelijkmatig was, werd er de voorkeur aan gegeven deze hoeveelheid zaaizaad op één veldje van 10 m² uit te zaaien. Het resultaat van het onderzoek kon begin juli worden vastgesteld door het aantal door stuifbrand aangetaste pluimen te tellen.

RESULTATEN

Tabel 1 geeft een overzicht van de resultaten. Met de natte vacuüm-methoden van HAARRING (I en II) werd het hoogste percentage aangetaste pluimen bereikt (12 tot 16 %). Het blijkt echter niet noodzakelijk te zijn de door HAARRING aanbevolen voedingsoplossing te gebruiken, want met leidingwater werd het zelfde resultaat verkregen.

De methoden III en VI, waarbij het zaad en de sporen in droge toestand werden vermengd, leidden slechts tot een zeer geringe besmetting (ca. 1 %). Het verlagen van de luchtdruk bleef in dit geval dus zonder gevolg.

De methoden van PONCHET (IV en V) leverden een zeer bevredigend resultaat op (ca. 8 % stuifbrandpluimen). Vermoedelijk is de kans op infectie bij methode V groter dan bij methode IV.

TABEL 1. Vergelijkend onderzoek van verschillende methoden om haver kunstmatig met stuifbrand te besmetten.
Comparison of different methods of artificial contamination of oats with loose smut.

Omschrijving van de methode *Description of the method*	Stuifbrandpluimen per 10 m² *Smutted panicles per 10 m²*			
	1956		1957	
	Aantal *Number*	%	Aantal *Number*	%
I. Natte vacuüm-methode met voedingsoplossing *Wet vacuum method with nutrient solution*	369	12	510	16
II. Natte vacuüm-methode met leidingwater *Wet vacuum method with tap water*	402	13	483	15
III. Droge vacuüm-methode *Dry vacuum method*	24	1	29	1
IV. 6 uur ondergedompeld in een sporensuspensie; daarna direct gedroogd *6 hours submerged in a spore suspension; dried directly afterwards*	192	6	223	7
V. 12 uur voorgeweekt en daarna gemengd met droge sporen *12 hours presoaked in water and afterwards mixed with dry spores*	174	6	363	11
VI. Sporen en zaad in droge toestand gemengd *Mixing of dry spores and dry seed*	–	–	31	1

Tabel 2 toont aan, dat indien het zaad direct na de behandeling werd gedroogd, er meer zieke pluimen ontstonden, dan indien het zaad eerst enige tijd op filtreerpapier werd bewaard en daarna werd gedroogd.

Omdat bij de methode van PONCHET geen exsiccator en luchtzuigpomp worden

TABEL 2. Invloed van de tijd tussen besmetting en drogen van het zaad op de mate van aantasting. Getallen geven het aantal stuifbrandpluimen per 10 m² aan.
Influence of the time between contamination and drying of the seed on the degree of infection. Numbers indicate the smutted panicles per 10 m².

Omschrijving van de methode *Description of the method*	uren (*hours*)	Tijd (in uren) tussen infectie en drogen *Time (in hours) between contamination and drying*			
		0	20	40	60
IV. Tijd van onderdompeling in sporensuspensie *Time of submersion in a spore suspension*	6	223	71	89	57
	12	111	119	63	31
V. Tijd van weken voor het mengen met droge sporen *Time of presoaking before mixing with dry spores*	6	366	59	79	125
	12	363	264	173	57

gebruikt, kan deze veel eenvoudiger worden uitgevoerd dan die van HAARRING. Dat de besmettingsgraad iets lager ligt dan bij de methode van HAARRING, is voor het onderzoek van zaadontsmettingsmiddelen geen bezwaar.

De 10 % aangetaste pluimen in de nateelt van het niet ontsmette zaad geven voldoende ruimte om de fungicide werking van de middelen te leren kennen.

SAMENVATTING

Bij het onderzoek naar de fungicide werking van zaaizaadontsmettingsmiddelen voor granen is het zeer gewenst te beschikken over een partij haver, die zwaar met stuifbrand is besmet. In verband hiermede zijn enkele methoden vergeleken om haver kunstmatig met stuifbrand te besmetten.

De zwaarste aantasting (ca. 14 %) werd verkregen, indien volgens de natte vacuüm-methode van HAARRING werd gewerkt. Bij deze methode bleek het vervangen van de voedingsoplossing door leidingwater geen afbreuk te doen aan het resultaat.

Een iets lager percentage (ca. 10 %) stuifbrandpluimen werd bereikt bij de dompel- en de voorweek-methode van PONCHET. De mate van aantasting mag echter nog ruim voldoende worden geacht om de volgens deze methode besmette partij geschikt te doen zijn voor gebruik bij het onderzoek van zaadontsmettingsmiddelen. Een voordeel van de methode van PONCHET boven die van HAARRING is, dat hierbij geen exsiccator en luchtzuigpomp benodigd zijn. De methode is dan ook zeer geschikt voor het verkrijgen van besmet zaaizaad, bijvoorbeeld voor het aanleggen van een demonstratieveldje met haverstuifbrand.

Andere onderzochte methoden, waarbij de zaden en de sporen zonder toevoeging van water werden vermengd, leverden slechts een zeer gering percentage (ca. 1 %) aangetaste pluimen op.

Bij alle besmettingsmethoden gold, dat direct drogen van het zaad na de behandeling de mate van aantasting deed toenemen.

SUMMARY

Seeds of oats contaminated with loose smut were used for testing the fungicidal value of cereal seed disinfectants. As it was impossible to obtain contaminated seed from the field in recent years several methods for artificial contamination were tried.

The best result (14 % of smutted panicles) was obtained with the „wet vacuum" method of HAARRING. With the aid of a dessiccator and a water jet pump the air between the glumes and kernels was replaced by a spore suspension. The degree of infection was the same when the nutrient solution was replaced by tap water.

The method used by PONCHET gave 10 % of diseased panicles. Here the seed is merely submerged in a spore suspension or is presoaked in tap water and mixed afterwards with dry spores. To obtain contaminated seeds of oats for the testing of seed disinfectants this method is preferable because of its easy application and the satisfactory degree of infection obtained.

Some other methods of mixing seed and spores without the addition of water gave only 1 % of smutted panicles. The highest degree of diseased plants was obtained when the seed was dried directly after the artificial contamination.

LITERATUUR

HAARRING, F., – 1930. Eine Infektionsmethode für Haferflugbrand (Ustilago avenae JENS.) und ihre Anwendung zu Beiz- und Immunitätsversuchen im Laboratorium und Feld. Bot. Arch. 29: 444–473.

PONCHET, J., – 1955. Sur le traitement de la carie du blé et du charbon de l'avoine. Ann. Epiphyt. 3: 301–313.

93/IPC

VERENIGINGSNIEUWS

De najaarsvergadering op 31 oktober 1957

Ir. P. H. van de Pol sprak over het belang van een keuring op virusziekten van bloemisterijgewassen tijdens het groeiseizoen. Virusziekten veroorzaken bij genoemde groep van gewassen een vermindering van de produktie en van de kwaliteit. Ten aanzien van de opbrengst is dit bijvoorbeeld aangetoond bij anjer en pelargonium en ten aanzien van de kwaliteit bij anjer, fresia en chrysant. Behalve dat het aantal bloemen sterk kan teruglopen, neemt ook de handelswaarde er van af.

Niet alleen de binnenlandse handel heeft echter belang bij goed opzuiveren en gezonde moerplanten. Ook met het oog op de export is het van belang te letten op het eventueel voorkomen van virusziekten. Dit kan alleen gebeuren door een veldkeuring in het jaar voorafgaande aan het jaar van export. Voor zover dit niet reeds door de N.A.K. geschiedt, wordt dit door de P.D. uitgevoerd of zijn de plannen hiertoe in voorbereiding.

Ir. J. Luitjes besprak zijn onderzoek over de economische betekenis van insektenplagen in bossen. In 1950–'51 werden vele bossen van de grove den in ernstige mate aangetast door *Diprion pini*. Aan de hand van boorspaandertjes genomen op 1,30 m hoogte van de bast tot het hart van de stam werd de groeivermindering vastgesteld bij bomen, die in verschillende mate waren aangetast. Gevonden werd, dat indien ten tijde van de aantasting 20%, 50% of 85% van de naalden was weggevreten, de groei in de eerstvolgende vijf jaren resp. 1, 2,05 en 3,35 groeiseizoenen ten achter bleef. Bij een 20-jarig bos van de boniteitsklasse 4 is de bestrijding rendabel te achten, indien het bladverlies ca. 8% of meer zal gaan bedragen. Men is aan de hand van tellingen van het aantal excrementen van de jonge rupsen nog bezig na te gaan op welke wijze het te verwachten bladverlies kan worden bepaald.

Drs. J. C. Zadoks gaf een overzicht van het onderzoek betreffende de gele roest bij tarwe. In 1955 en '57 heeft deze ziekte voor ca. 3 miljoen gulden schade veroorzaakt in ons land. Het is nu bekend, dat de schimmel in ons land kan overwinteren en overzomeren. Knipaartjes, doorwas en opslag van tarwe zorgen ervoor, dat gedurende het gehele jaar jong groen tarweblad aanwezig is, dat gemakkelijk door de roest kan worden aangetast. Een nat najaar (onvoldoende gelegenheid tot stoppelen) en een milde winter werken het optreden van een epidemie in de hand. De aantasting van het vangsortiment te Lelystad wijst er op, dat de sporen zich over een grote afstand kunnen verspreiden. Behalve het Heine's VII-fysio is nu ook het Capellefysio gevonden. Beide komen over vrijwel geheel Europa voor. Andere gastheren dan tarwe (grassen) spelen geen rol van betekenis.

Ir. J. A. J. Veenenbos, *Secretaris*

BOEKBESPREKING

W. M. Docters van Leeuwen, met medewerking van H. Alta en J. Gremmen. Gallenboek. Bibliotheek der Kon. Ned. Natuurhistorische Vereniging, uitgave no. 8. 2e druk. Uitg. N.V. W. J. Thieme en Cie, Zutphen. Prijs: voor de leden der K.N.N.V. f 7,50, voor niet-leden f 9,25.

Wie een exemplaar van deze heruitgave in handen heeft, zal bemerken, dat het „Gallenboek" sinds de eerste druk wel zeer is vooruitgegaan. Het is nu gedrukt op een mooie kwaliteit papier, waardoor de vele fraaie afbeeldingen van de heer Alta beter tot hun recht komen. Het geheel is in stevig, grijs linnen gebonden.

Door de medewerking van de heer Gremmen konden thans ook de door planten veroorzaakte gallen worden opgenomen, hetgeen het „Gallenboek" als determineerwerk zeer aan waarde deed winnen. Het bestek liet, helaas, niet toe om ook hiervan afbeeldingen op te nemen.

Werden in de eerste druk 937 gallen genoemd, nu is dit aantal gestegen tot 1272. Bij vele gallen staat thans aangegeven of ze algemeen dan wel zeldzaam zijn, terwijl soms ook de vindplaats wordt genoemd. Met de aldus gecompleteerde beschrijvingen kunnen de identiteit, de waardplantenreeks en het verspreidingsgebied worden opgespoord van menige insekte- of schimmelsoort, die schadelijk is voor land- en tuinbouwgewassen.

Het foutenduiveltje speelde met het galmuggeslacht *Misospatha*, dat door Kieffer in 1913 werd beschreven en op blz. 112 onder no. 119 als *Misopatha* staat vermeld, terwijl de door mij in 1953 beschreven *Giraudiella incurvans* op blz. 186 onder no. 621 abusievelijk *Giraudiella incurvata* werd genoemd. Enkele andere correcties werden reeds op blz. 332 van het „Gallenboek" opgenomen. De literatuurlijst onderging enkele kleine wijzigingen.

Deze herdruk is mogelijk gemaakt door de medewerking van de Uyttenboogaart-Eliasen-Stichting, de Amsterdamse Universiteitsvereniging, het Dr. Jac. P. Thijsse-fonds en het Greshoff-fonds van de K.N.N.V.

W. Nijveldt